

UNIVERSIDAD DE ALCALÁ
Departamento de Medicina

**CENTRO DE INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA EN RED DE
ENFERMEDADES HEPÁTICAS Y DIGESTIVAS (CiberEHD)**

Instituto de Salud Carlos III



**Universidad
de Alcalá**



**RELEVANCIA DEL HÍGADO
EN LA INDUCCIÓN DE LA INFLAMACIÓN SISTÉMICA
EN RATAS CON CIRROSIS COMPENSADA**

TESIS DOCTORAL

MARÍA P. UBEDA CANTERA
Alcalá de Henares, 2010

UNIVERSIDAD DE ALCALÁ

Departamento de Medicina

**CENTRO DE INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA EN RED DE
ENFERMEDADES HEPÁTICAS Y DIGESTIVAS (CiberEHD)**

Instituto de Salud Carlos III



Universidad
de Alcalá



**RELEVANCIA DEL HÍGADO
EN LA INDUCCIÓN DE LA INFLAMACIÓN SISTÉMICA
EN RATAS CON CIRROSIS COMPENSADA**

TESIS DOCTORAL

María P. Ubeda Cantera

DIRECTORES DE TESIS

Agustín Albillos Martínez,

Catedrático de Medicina,

Departamento de Medicina, Universidad de Alcalá.

CIBER de Enfermedades Hepáticas y Digestivas (CiberEHD),

Instituto de Salud Carlos III.

Melchor Álvarez de Mon Soto,

Catedrático de Medicina,

Departamento de Medicina, Universidad de Alcalá.

CIBER de Enfermedades Hepáticas y Digestivas (CiberEHD),

Instituto de Salud Carlos III.

Con todo mi cariño, a mis padres
"If today was perfect, there would be no need for tomorrow"

AGRADECIMIENTOS

Siempre me han tachado de ser poco dada a mostrar mi cariño y gratitud, supongo que esta es una excepcional ocasión para demostrar lo contrario y dejar escrito todo aquello que siento y que al parecer no soy capaz de expresar, solo hay un problema, a pesar de mi estupenda memoria podría olvidarme de alguien, espero que no sea ese el caso y saber agradecer fielmente a todas y cada una de las personas (y animales) implicadas en el transcurso de este largo viaje que va camino de los 8 años.

A la primera persona que debo agradecer encontrarme en este punto de mi vida es al Dr. Mampaso, el primero que confió en mi capacidad como investigadora. Primero nos separó el dinero, mejor dicho la falta de él, después la vida...allá donde estés, gracias. Hablar de los tiempos del Dr. Mampaso es hablar de Ana Molina, Laura García-Bermejo y María Escribese, mis compañeras, profesoras y amigas durante ese año. Gracias Ana por enseñarme a dar mis primeros pasos en citometría de flujo y experimentación animal. A ti, Laura, gracias por enseñarme los entresijos del mundo científico, por hablarme claro cuando otros no lo hacían y sobre todo por seguir ahí después de todos estos años. Gracias María por nuestras charlas de última hora, cuando ya no quedaba nadie por el laboratorio.

Siguiendo con el año I b.A. (*before Alcalá*) no podría olvidar a los veterinarios del Hospital Ramón y Cajal, Carlos Correa y Ana Ortiz, que además de enseñarme, saciaban mi curiosidad dejándome hacerles de auxiliar cuando tenían alguna que otra operación, lo recuerdo con gran satisfacción.

Y llegamos al año cero A.A., de Agustín Albillos, porque gracias a él me incorporé al grupo de trabajo que tanto ha cambiado mi vida, profesional y personalmente hablando. Gracias Agustín por tu tiempo y dedicación, por ampliar mis conocimientos y sobre todo gracias por confiar en mí. También, porqué no decirlo, perdón por aquellas ocasiones en las que mi temperamento, nada dócil, haya chocado con tu temperamento castellano.

No puedo ni debo olvidar agradecer al Dr. Álvarez de Mon dejarme formar parte de su departamento y darme todos los medios necesarios para el desarrollo de esta tesis.

A Alfredo Prieto, el mundo científico en general y nuestro laboratorio en particular no pueden calcular las consecuencias de haber desaprovechado un cerebro como el tuyo. A Eduardo Reyes, gracias por tu ayuda y tus consejos, por tu contribución experimental en este trabajo y por tu humor afilado, nunca te rindas. A Jorge Monserrat, gracias tu participación en el desarrollo de este trabajo.

Y llega el turno de los compañeros de trabajo, con los que he compartido pipetas, centrifugas, sonrisas y lágrimas. Tengo tanto que agradecerles a todos...a los de hoy y a los de ayer. En primer lugar a Mariajo, mi alma gemela, desde el primer momento una mirada nos ha bastado para comunicarnos, eres infinitamente más que una compañera de trabajo, eres mi amiga. Junto con Let, nuestro guía espiritual

(codirectora en la sombra y ardua correctora de este trabajo) y Marga, el oráculo del grupo, formamos el “*rat team*”, el “*Agus team*”...pero lo principal es eso, el *team*, ¡¡¡somos un equipo !!!.

A Esther, gracias por instruirme acerca del sistema inmune (y a tu chico, Javier, por sus dibujos) pero sobre todo, gracias por tu agradable tertulia cafetera. A Zaida, recién incorporada, la paciencia es la madre de la ciencia. A Hugo, gracias por estar siempre de buen humor, por alegrarnos con tus risas incluso cuando las circunstancias eran más propicias al llanto. A Míquel, nuestro mejor suministrador de coñas post-congreso, no hay anticuerpo humanizado que se le resista, gracias por involucrarte tanto en todo y responsabilizarte de lo que otros rehúyen, eres una gran persona y mejor amigo.

A los compañeros de ayer, que ya no están pero dejaron huella. Mónica, súper mami, cofundadora del “*rat team*”, nos dejaste por la psiquiatría, ¡qué gran visionaria!, gracias por tu saber estar, tu manera de desenvolverte en la vida, tu alegría contagiosa. Sonia, mi rubia terremoto, gracias por estar siempre a mi lado y confiar en mí. Paz, la generosidad personificada, me abriste las puertas de tu casa sin apenas conocerme, eternamente gracias. Ana, trabajadora incansable, ingratamente tratada. Elisa, te llevo en mi corazón, gracias por enseñarme tu visión de la vida y de la ciencia. Inés, un ejemplo a seguir, te mereces todo lo mejor, gracias por ser mi médico, mi amiga, mi consejera. Espe, Bárbara, Lucho (el maestro), Julio, Leo...cada uno a su manera, han contribuido y son parte importante de este trabajo.

A las secretarias del departamento, M^a José, Maribel y Laura, por todos los trámites que amablemente me han ayudado a realizar. A Juan, nuestro secretario más dicharachero de Barrio Sésamo, gracias por las gestiones, por los escáner, por los secretos no tan secretos, por los conciertos...te debo uno “u dos” cubatas...tienes más cuento que Calleja.

A José María Orellana, veterinario del Centro de Experimentación Animal, porque su ayuda ha sido muy importante para conseguir este objetivo. Mención especial para Ángel y Mariano, personal del Centro, gracias por las risas y por el cuidado de los animales objeto de este estudio.

A la Dra. Lledó, del Dpto. de Microbiología, el Dr. Moreno, del Dpto. de Anatomía Patológica del Hospital Ramón y Cajal, y los Drs. Such y Francés, del Servicio de Gastroenterología del Hospital General Universitario de Alicante, por su contribución experimental y compromiso con el proyecto.

Mención también para quienes, no sin gran dolor, no quiero nombrar, pero que en algún momento del camino formaron parte importante del proceso...qué gran decepción.

En el terreno personal debería incluir a parte de las personas que he nombrado en epígrafes anteriores, del mismo modo que algunos de los agradecimientos personales deberían incluirse también en el ámbito

profesional. Para muestra un botón, David, primero compañero de trabajo, después compañero de vida. Sin ti esta etapa de mi vida no habría tenido sentido, eres mi Mendel, mi Newton, mi Einstein, mi Shapiro, mi Gates... Eternamente gracias.

A mis padres, gracias por estar ahí, aquí, allí...donde fuere, siempre y en todo lugar, en mis buenos y malos momentos y por supuesto en los mejores y en los peores (que también los hubo), resumir todo en un simple gracias me parece tan ingrato, jamás podré recompensaros por vuestro apoyo. Os quiero.

A mi hermano, que como el Guadiana aparece y desaparece, pero afortunadamente está más aparecido que nunca. Hay que reconocer que tenemos una relación de lo más especial. Recuerda siempre que te quiero.

A mi familia en general, pero a los de Cihuri en particular, mi abuela Pili, mis tíos Luis Mª y Angelines, mis primos Iván, Silvia, Luis, María...gracias a todos, por todo. No puedo evitar recordar en este momento a mi abuelo Poldo, hay tantos recuerdos felices que me unen a tí...

A mis mejores amigas, Bea y Noe, las mejores fisioterapeutas del mundo. Qué ironía pensar que era yo vuestra auxiliar pero fuisteis vosotras quienes acudisteis en mi auxilio. Tenéis un corazón tan enorme...no se que hubiera hecho sin vosotras. Gracias, gracias, gracias. A Iván, el más veterano de los amigos, da igual el tiempo que pase, siempre estarás para darme un buen consejo. A Ainhoa, María y Rocío, que han regresado a mi vida como si nunca me hubiera ido...feisbuc, qué gran invento.

Y ahora el turno de los animales. Uno que mejor que nadie ha sabido darme amor y cariño de la forma más incondicional y sincera...Vodka, mi perro, que me acompaña fielmente desde hace 13 largos años, aún siento tu cabeza apoyada en mis pies bajo la mesa del escritorio mientras estudiaba para algún examen. Amigo fiel, siempre te esperaré sentada al final del pasillo para que vengas a jugar conmigo. Gracias también a mis pequeños roedores, que tantos buenos y malos momentos me han dado (y algún que otro susto también) y que son la base de mi carrera profesional, tanto a los ratones con los que empecé como a "mis Stuart", mis queridas ratillas, gracias por vuestra aportación desinteresada e inconsciente al desarrollo de este trabajo, algún día vuestro trabajo salvará vidas, no habrá sido en balde, ese es mi mayor deseo.

A todos, de todo corazón, muchas gracias.

ÍNDICE

ABREVIATURAS	19
SUMMARY	23
INTRODUCCIÓN	27
1. Heterogeneidad del sistema inmune	29
1.1. Componentes celulares del sistema inmune	30
1.2. Recirculación y activación linfocitaria	32
1.3. Componentes moleculares del sistema inmune	35
2. Anatomía y funciones del hígado	37
2.1. Anatomía	37
2.1. Funciones	38
2.2.1. Función metabólica	39
2.2.2. Función inmunitaria	41
3. Cirrosis hepática: definición y complicaciones	43
3.1. Definición y estadios de la cirrosis	44
3.2. Complicaciones de la cirrosis	45
3.2.1. Insuficiencia hepática	45
3.2.2. Hipertensión portal	46
4. Cirrosis hepática y sistema inmune	47
4.1. Implicación del sistema inmune en la patogenia de la fibrogénesis hepática	47
4.2. Activación sistémica del sistema inmune en la cirrosis hepática	48
4.3. Implicación de la traslocación bacteriana intestinal	50
JUSTIFICACIÓN E HIPÓTESIS	53
OBJETIVOS	57
MATERIALES Y MÉTODOS	61
1. Modelo experimental	63
2. Diseño experimental	63
2.1. Protocolo I	63
2.2. Protocolo II	64
3. Extracción de muestras y obtención de suspensiones celulares	65
4. Parámetros bioquímicos de función hepática y renal	68

5. Anatomía patológica	69
6. Estudio inmunofenotípico	69
7. Determinación de marcadores inflamatorios	74
8. Estudio microbiológico	74
9. Aislamiento, amplificación y secuenciación de ADN bacteriano	75
10. Análisis estadístico	76
11. Búsqueda bibliográfica	77

RESULTADOS 79

1. Inducción de cirrosis, mortalidad y parámetros bioquímicos de función hepática y renal	81
2. Estudio inmunofenotípico de sangre periférica	82
3. Estudio de marcadores inflamatorios séricos	84
4. Signos de activación de las células mononucleares de hígado	85
5. Signos de activación de las células mononucleares del ganglio linfático hepático	88
6. Signos de activación de las células mononucleares del ganglio linfático mesentérico	90
7. Estudio microbiológico del ganglio linfático mesentérico	91
8. Efecto de la decontaminación intestinal con antibióticos	94
9. Correlación del grado de activación de las células del sistema inmune en los diferentes compartimentos anatómicos de las ratas cirróticas	97
10. Efecto de la administración de CCl ₄ a corto plazo en las células del sistema inmune	99

DISCUSIÓN 103

1. Expansión y activación de las células del sistema inmune de sangre periférica en ratas con cirrosis compensada	105
2. Expansión y activación de las células del sistema inmune de los ganglios linfáticos hepático y mesentérico en ratas con cirrosis compensada	106
3. Relevancia patogénica de la traslocación bacteriana intestinal en la fase compensada de la cirrosis.	107
4. El estado proinflamatorio sistémico característico de la cirrosis compensada se inicia en el territorio hepático	109
5. Cirrosis por CCl ₄ en rata: un modelo para el estudio de las alteraciones del sistema inmune en la cirrosis	110

CONCLUSIONES 115

BIBLIOGRAFÍA 119

ANEXO I: Financiación	133
------------------------------	-----

ANEXO II: Publicaciones	137
--------------------------------	-----

1. A. Albillos, L. Muñoz, M. Nieto, M. Ubeda, A. de la Hera, M. Álvarez-Mon. Sistema inmune inflamatorio en la cirrosis. Relevancia de la traslocación bacteriana. *Gastroenterol Hepatol* 2006;29(Supl 1):1-4.
2. A. Albillos, L. Muñoz, M. Nieto, M. Ubeda, A. de la Hera, M. Álvarez-Mon. Systemic effects of TNF α secreted by circulating monocytes and fatigue in cirrhosis. *Hepatology* 2006 Jun;43(6):1399.
3. A. Albillos, M. Nieto, M. Ubeda, L. Muñoz, Fraile B, Reyes E, Lledó L, Blanco I, Pastor O, Salas C, Lario M, Monserrat J, Bataller R and Álvarez-Mon M. The biological response modifier AM3 attenuates the inflammatory cell response and hepatic fibrosis in rats with biliary cirrosis. *Gut*. 2010 Jul;59(7):943-52.
4. M. Ubeda, L. Muñoz, MJ. Borrero, D. Díaz, R. Francés, J. Monserrat, M. Lario, L. Lledó, J. Such, M. Álvarez-Mon, A. Albillos. Critical role of the liver in the induction of systemic inflammation in rats with compensated cirrhosis. *Hepatology* 2010 (aceptado para publicación).

ABREVIATURAS

16SrARN: ácido ribonucleico de la proteína ribosomal pequeña 16

ADN: ácido desoxirribonucleico

ADNbact: ácido desoxirribonucleico de origen bacteriano

ALT: alaninoaminotransferasa.

AST: aspartatoaminotransferasa.

APC: alofococianina

APCs: células presentadoras de antígeno

BCR: receptor de membrana de los linfocitos B

CCl₄: tetracloruro de carbono

CD: grupos de diferenciación

CpG: secuencias específicas de ADN que contienen los dinucleótidos citosina-guanina de forma no metilada.

DCs: células dendríticas

ELISA: ensayo inmunoabsorbente conjugado a enzimas

FCS: suero bovino fetal

FITC: isotiocianato de fluoresceína

GALT: tejido linfoide asociado al intestino

GGT: gamma glutamil transpeptidasa

GLH: ganglio linfático hepático

GLM: ganglio linfático mesentérico

HEV: vénulas del endotelio alto

IFN γ : interferón gamma

Ig: inmunoglobulina

IL: interleuquina

LBP: proteína de unión al lipopolisacárido bacteriano

LPS: lipopolisacárido bacteriano

LTA: ácido lipoteicoico

MALT: tejido linfoide asociado a mucosas

MCP-1: proteína quimioatrayente de monocitos tipo 1

MHC: complejo mayor de histocompatibilidad

NK: natural killer

PBS: tampón fosfato

PCR: reacción en cadena de la polimerasa

PE: ficoeritrina

PerCP: peridín clorofila proteína

rpm: revoluciones por minuto

SBI: sobrecrecimiento bacteriano intestinal

sTNFR: receptor soluble del factor de necrosis tumoral

TBI: traslocación bacteriana intestinal

Tc: célula T citotóxica (T CD8+)

TCR: receptor de linfocito T

TGF β : factor de crecimiento transformante beta

Th: célula T cooperadora (T CD4+; T helper)

TLR: receptores de tipo Toll

TNF α : factor de necrosis tumoral alpha

T_{MC}: célula T memoria central

T_{ME}: célula T memoria efectora

T_{MEiT}: célula T memoria efectora no terminada

T_{MET}: célula T memoria efectora terminada

UFC: unidades formadoras de colonias

SUMMARY

Background: The immune system is a complex network of cells and molecules that play a relevant role in the defence against infections through its ability to recognize and develop a response against non-self antigens. Although the inflammatory response is essential for maintaining tissue homeostasis, protecting against infection and mediating immune responses, it can also contribute to tissue injury. In fact, the immune system is abnormally activated at the systemic level in patients and experimental models with cirrhosis and ascites contributing to the progression of the disease. Immunitary cells become activated after interacting at the mesenteric lymph nodes (MLN) with bacteria translocated from the gut, and thereafter reach the bloodstream by recirculation. The alteration is characterized by expansion of activated lymphocytes and monocytes in peripheral blood and an increased production of proinflammatory cytokines. Despite the pivotal role of systemic activation of the immune system in cirrhosis, it is unknown if this abnormality already exists in the compensated pre-ascitic stage of the disease. It is possible to hypothesize that the liver, the main organ of inflammation in cirrhosis, has a crucial role as a source of abnormally activated monocytes and lymphocytes.

The **aim** of this study was to investigate whether there is in fact systemic activation of the inflammatory immune system in rats with compensated CCl₄-induced cirrhosis, and if so to establish the pivotal site where immune system cells become activated.

Material and methods: We studied the phenotype and activation status of lymphocyte and monocyte subpopulations in peripheral blood, liver and in mesenteric and hepatic lymph nodes (HLN) in rats with cirrhosis without ascites (n=28) and in healthy, phenobarbital-treated age- and sex-matched rats (n=20). Cirrhosis was induced by carbon tetrachloride (CCl₄) feeding by gavage on a weekly basis and rats were sacrificed at 12 weeks, when cirrhosis without ascites is almost constantly present. A subgroup of rats with cirrhosis without ascites (n=14) received a 2-week course of broad-spectrum oral non-absorbable antibiotics, or placebo, to investigate the impact of enteric bacterial products on the immune system cells. Finally, we examined the phenotype and activation status of immune cell subpopulations in rats receiving the first three doses of CCl₄ (n=5) or only phenobarbital in the drinking water (n=5).

Results: Systemic inflammation was present in cirrhotic rats, as shown by expansion ($p<0.01$) of circulating total and inflammatory monocytes, and recently activated CD134⁺ Th-cells. The same populations of cells were increased ($p<0.01$) in MLN and HLN. Bacterial translocation was absent

in cirrhotic or control rats, but bacterial DNA fragments were present in the MLN of 54% of cirrhotic rats. The liver and not the gut was the source of the activated immunitary cells present in blood, as shown by the direct correlation between activated Th-cells in blood and HLN, but not in MLN, and the normalization by gut decontamination with antibiotics of activated cells in MLN, but not in blood or HLN.

Conclusion: In experimental cirrhosis, systemic activation of the immune system occurs before ascites development and is driven by recirculation of cells activated in the HLN. Besides, in compensated cirrhosis, bacterial DNA fragments reach the MLN, where they elicit a local inflammatory response.

INTRODUCCIÓN

1. Heterogeneidad del sistema inmune

El sistema inmune constituye una compleja red estructural y funcional de múltiples células y moléculas cuya característica biológica esencial es la capacidad de reconocimiento específico por medio de interacciones entre sus componentes con los restantes componentes del organismo y con los posibles elementos extraños (antígenos) que puedan penetrar en el cuerpo humano (Janeway, 2004). Este reconocimiento desencadena respuestas frente a aquellas células o partículas portadoras del antígeno inductor. La capacidad de reconocimiento antígeno específico y de desarrollo de una respuesta efectora concede al sistema inmune una importante función defensiva frente a la agresión por componentes extraños no propios, como los gérmenes, o la transformación neoplásica de células propias. Pero a pesar de que la respuesta inmune sea esencial para el mantenimiento de la homeostasis tisular, en ocasiones puede contribuir a aumentar el daño en los tejidos (Henson, 2005).

El sistema inmune está formado por órganos linfoides primarios y secundarios en los cuales se generan, seleccionan y adquieren su función las células implicadas en la respuesta inmune. Los órganos linfoides primarios o hematopoyéticos, médula ósea y timo, tienen como función principal la generación de componentes celulares del sistema inmune. Los órganos linfoides secundarios, ganglios linfáticos y bazo, forman una extensa red por todo el organismo a través de la cual recirculan las células maduras del sistema inmune, entran en contacto con los posibles antígenos y sufren los procesos de selección, activación y proliferación necesarios para establecer la respuesta inmune. Existen otros órganos secundarios formados por agrupaciones de células asociadas a mucosas (MALT), principalmente la piel, y a tubo digestivo (GALT), que engloba las amígdalas, las placas de Peyer y el apéndice, son zonas en contacto directo con el exterior y por lo tanto constituyen la primera línea de defensa contra componentes extraños (Delves *et al.*, 2000 a y b; Janeway, 2004).

Dependiendo del antígeno y de los mecanismos empleados por el sistema inmune en su reconocimiento, se pueden generar dos tipos de respuestas diferentes pero íntimamente relacionadas, la respuesta inmunológica innata, primera línea de defensa capaz de reconocer patrones moleculares asociados al patógeno, y la respuesta inmunológica adquirida, que se caracteriza por el reconocimiento de moléculas extrañas a través de receptores presentes en células T y células B, amplificando y reclutando mecanismos efectores de la respuesta innata que le permite el control y

eliminación del microorganismo. Estos dos brazos biológicos trabajan juntos, se sinergizan optimizando los mecanismos de defensa inmunológicos (Chaplin *et al.*, 2006).

1.1. Componentes celulares del sistema inmune

Los componentes celulares del sistema inmune son los linfocitos, agrupados en linfocitos T, linfocitos B y células NK, y las células mieloides, que constituyen un grupo heterogéneo de células entre las cuales se incluyen los monocito/macrófagos y las células dendríticas (DCs).

Los linfocitos son células efectoras, que contribuyen con la respuesta inmunológica adquirida, pero que necesitan de la colaboración de células presentadoras de antígeno (APCs) para su activación y regulación. Estas APCs, que contribuyen con la respuesta inmunológica innata, entran en contacto con el antígeno, lo procesan y lo presentan a los linfocitos cuando recirculan por los órganos linfoides secundarios (MacKay *et al.*, 1992; Delves *et al.*, 2000 a y b; Parkin *et al.*, 2001; Janeway, 2004).

Los linfocitos T, cuya identidad viene definida por la expresión clonal en su membrana citoplasmática de receptores específicos (receptor de célula T, TCR). Se caracterizan por reconocer antígenos asociados a moléculas del sistema principal de histocompatibilidad (MHC) expresadas por las APCs. Tras el reconocimiento antigénico se produce la activación del linfocito y su transformación en célula efectora cuya función estará determinada por el microambiente inmunológico. Se dividen en dos clases principales, los linfocitos T citotóxicos (Tc) que matan células infectadas por virus, y los linfocitos T cooperadores (Th), que activan a otros tipos celulares como las células B y los macrófagos. A su vez, dentro de los linfocitos Th existe una polarización hacia Th1 o Th2 caracterizada por un patrón de expresión de citoquinas específico. Así, en la respuesta tipo Th1 las células Th producen Interferón gamma (IFN γ) e interleuquina 2 (IL-2) mientras que en la respuesta Th2 producen IL-4 e IL-5 (Delves *et al.*, 2000 a y b; Kidd, 2003; Janeway, 2004).

Los linfocitos B se caracterizan por la expresión en membrana del receptor de células B (BCR) cuyo componente principal son las inmunoglobulinas (Igs) que funcionan como receptores de antígenos. El reconocimiento del antígeno por la Ig desencadena la activación y diferenciación de las células B en células plasmáticas que secretan anticuerpos. Además de su función efectora, los linfocitos B también son APCs que

activan a los linfocitos T y los capacitan para desarrollar sus funciones de reconocimiento y eliminación de antígenos (Janeway, 2004).

Las células NK carecen de receptores específicos de antígeno y forman parte del sistema inmune innato. Engloban una población heterogénea de linfocitos con actividad citotóxica capaz de detectar y lisar células tumorales o infectadas por virus independientemente del reconocimiento antigénico (Ortaldo *et al.*, 1984; Janeway, 2004).

Los monocito/macrófagos son células con capacidad fagocítica de amplio espectro, se distribuyen por todo el cuerpo y su morfología varía dependiendo del tipo de tejido al que se asocian (Beutler, 2004). Los monocitos circulantes en la sangre periférica son una población heterogénea de células capaces de extravasarse a los tejidos dando lugar a células especializadas (monocitos residentes) o de migrar a tejidos inflamados (monocitos inflamatorios) y diferenciarse en macrófagos (Steiniger *et al.*, 2001; Yrlid *et al.*, 2006; Geissmann *et al.*, 2003). Poseen receptores tipo “toll” (TLR), componentes que reconocen estructuras altamente conservadas en los patógenos. Existen 10 tipos diferentes de TLRs cuya activación desencadena una respuesta efectora dentro de la inmunidad innata, así el TLR4 reconoce el lipido A del lipopolisacárido (LPS) de membrana de las bacterias Gram negativas, el TLR2 reconoce el ácido lipoteicoico (LTA) y el TLR9 reconoce secuencias específicas de ácido desoxirribonucleico (ADN) no metilado (motivos CpG) (Sweet *et al.*, 1998; Chow *et al.*, 1999; Medzhitov *et al.*, 2000; Hemmi *et al.*, 2000; Wagner *et al.*, 2002). En la respuesta inmune adquirida (también llamada adaptativa o específica), los monocito/macrófagos son APCs profesionales con efectividad media en la presentación de antígenos en el contexto de MHC-II a linfocitos T. Los monocito/macrófagos también son grandes células efectoras que secretan una amplia variedad de citoquinas (IL-1, IL-6, IFN γ y Factor de Necrosis Tumoral α (TNF α)) y quimioquinas tras la activación recíproca con el linfocito T, que reclutan y activan nuevos linfocitos y otras células del sistema inmune generando un proceso de amplificación muy importante en la respuesta inmune específica (Janeway, 2004).

Las DCs son las APCs más especializadas, captan antígenos y los procesan para presentarlos a los linfocitos T induciendo su activación y proliferación. Su recirculación esta regulada por citoquinas y quimioquinas expresadas por células endoteliales linfáticas y linfocitos T (Caux *et al.*, 2000). Durante el proceso la célula expresa moléculas MHC II, receptores implicados en la activación de los linfocitos y quimiorreceptores que posibilitan su recirculación al ganglio linfático una vez que han captado el

antígeno. La expresión de TLRs por las DCs en tejido esta muy relacionado con la inmunidad innata frente a patógenos y, dependiendo del TLR señalizado, la célula producirá un determinado patrón de quimioquinas que, a su vez, inducirá el reclutamiento de una población concreta (neutrófilos, células NK o linfocitos activados), (Sallusto *et al.*, 2000a).

En la superficie de todas estas células se expresan moléculas de diferente estructura y función que pueden ser empleadas para su caracterización fenotípica por medio de marcajes con anticuerpos monoclonales. Estos antígenos de superficie son moléculas que pueden tener una amplia distribución y ser expresadas en otras estirpes celulares, o bien, limitadas a los linfocitos T o incluso a determinadas subpoblaciones linfocitarias. A cada conjunto de anticuerpos que reconocen una proteína o “marcador” y que identifican, un subconjunto particular, una determinada función o un estadio de diferenciación, se le aplica una designación “CD” (Cluster of Differentiation), a la que se llega por consenso en las conferencias internacionales realizadas al efecto.

1.2. Recirculación y activación linfocitaria

Los linfocitos T naive (también llamados novatos o vírgenes) recirculan continuamente desde la sangre a los ganglios linfáticos y otros órganos linfoides secundarios a través de las vénulas de endotelio alto (HEV), las cuales expresan moléculas para el reclutamiento constitutivo de los linfocitos. La linfa fluye a través de los ganglios, procedente de los tejidos periféricos, donde las DCs captan el material antigénico. En los tejidos inflamados, las DCs que transportan los antígenos son movilizadas hacia los ganglios de drenaje donde estimulan de manera antígeno-específica a las células T. Tras la estimulación, las células T proliferan por expansión clonal y se diferencian en células efectoras que expresan y/o pierden moléculas específicas que hacen posible su migración a los sitios de inflamación, (MacKay *et al.*, 1992; Young, 1999; Von Andrian *et al.*, 2000), (**Figura 1**).

La extravasación de los leucocitos desde la sangre a los órganos linfoides y tejidos consta de cuatro pasos: contacto, rodamiento, activación y captura. En cada uno de estos pasos los leucocitos y las células del endotelio expresan moléculas específicas que regulan estrechamente el proceso, ya sea mediante el reconocimiento célula a célula (selectinas e integrinas) o mediante factores solubles (quimioquinas). El patrón de selectinas, integrinas y quimiorreceptores actúa como código direccional que guía

la extravasación y migración preferencial de las células a microambientes específicos dentro de los diferentes tejidos, tanto en condiciones fisiológicas normales, como durante los procesos inflamatorios (MacKay *et al.*, 1992; Young, 1999; Delves *et al.*, 2000 a y b; Von Andrian *et al.*, 2000; Jenkins *et al.*, 2001; Parkin *et al.*, 2001; Janeway, 2004).

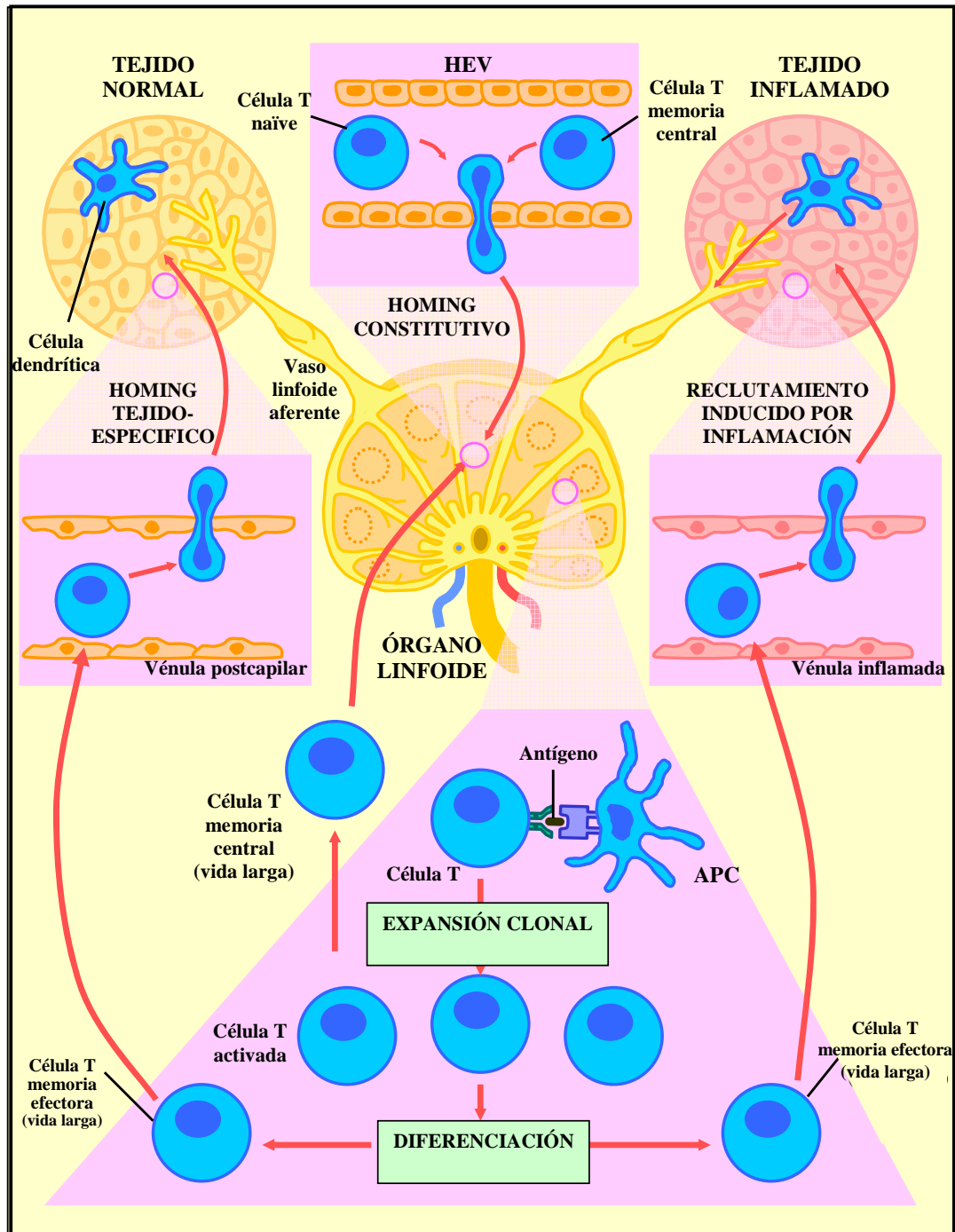


Figura 1. Ruta migratoria de células T

De este modo, las señales que dirigen a los linfocitos hacia los tejidos periféricos son órgano-específicas, es decir, las moléculas requeridas para migración a la piel (P-selectina) son diferentes de aquellas para migrar a tubo digestivo ($\alpha 4\beta 7$ y CCR9) o a hígado (VAP-1r) (Campbell *et al.*, 2002; Adams *et al.*, 2008), es más, están moduladas por distintos mediadores inflamatorios y son diferentes en los dos subgrupos de células Th (Th1 y Th2) que responden a diferentes quimioquinas (Von Andrian *et al.*, 2000).

Tras la estimulación del linfocito T naive, se generan dos subpoblaciones celulares con la misma experiencia antigénica pero diferente capacidad migratoria, i) las células T memoria central (T_{MC}), sin función inflamatoria, que expresan moléculas de recirculación similares a las células T vírgenes y que, por tanto, recirculan por órganos linfoides secundarios a la espera de un segundo encuentro antigénico más eficiente, y ii) las células T memoria efectoras (T_{ME}), que migran a tejidos no linfoides donde median reacciones inflamatorias y citotóxicas gracias a su rápida capacidad de producción de citoquinas como IFN γ o IL-4 (Sallusto *et al.*, 1999; Lanzavecchia *et al.*, 2005) (Figura 1).

Fenotípicamente, los linfocitos T naive y T memoria se han identificado por la expresión de las distintas isoformas del antígeno leucocitario común CD45 en humanos, siendo CD45RA⁺ las células T naive y CD45RO⁺ las células T memoria. A su vez, la expresión de quimiorreceptores como el CCR7 y la L-selectina (CD62L) son esenciales para la migración del linfocito a ganglio linfático, con lo que la co-expresión de estos receptores permite diferenciar a su vez los dos subtipos de células T memoria, de modo que, las células T naive serán aquellas CD45RA⁺CCR7⁺CD62L⁺ mientras que las células T_{ME} y las T_{MC} son CD45RO⁺CCR7⁻CD62L⁻ y CD45RO⁺CCR7⁺CD62L⁺, respectivamente (Sallusto *et al.*, 1999; Von Andrian *et al.*, 2000) (Figura 2).

No obstante, algunas células T_{ME} recuperan la expresión del CD45RA y presentan una mayor capacidad efectora (aquellas células T CD8⁺ que expresan el CD45RA poseen una mayor cantidad de perforina y granzima en su citoplasma). Por tanto, podemos distinguir a su vez entre células T memoria efectoras terminadas (T_{MET}), que expresan CD45RA⁺CCR7⁻CD62L⁻ y las células T memoria efectoras no terminadas (T_{MET}), que expresan CD45RO⁺CCR7⁻CD62L⁻ y poseen mayor capacidad de producción de citoquinas (Figura 2), (Hamann *et al.*, 1997; Rufer *et al.*, 2003; Seder *et al.*, 2003; Sallusto *et al.*, 2004).

Por analogía con los estudios en humanos, podemos identificar estas mismas subpoblaciones en linfocitos T de rata utilizando el CD45RC, otra isoforma del CD45, que igualmente combinado con la L-selectina, permite diferenciar fenotípicamente entre las células T novatas, CD45RC⁺CD62L⁺, las células T_{ME}, CD45RC⁺/CD62L⁻, y las células T_{MC}, CD45RC⁻CD62L⁺ (Spickett *et al.*, 1983; Ramírez *et al.*, 2000; Subra *et al.*, 2001). Siguiendo con la analogía, dentro de las células T_{ME} de rata, podemos distinguir entre las células T_{MET}, que expresan CD45RC⁺CD62L⁻, y las células T_{MEtT}, que expresan CD45RC⁻CD62L⁻ (Figura 2).

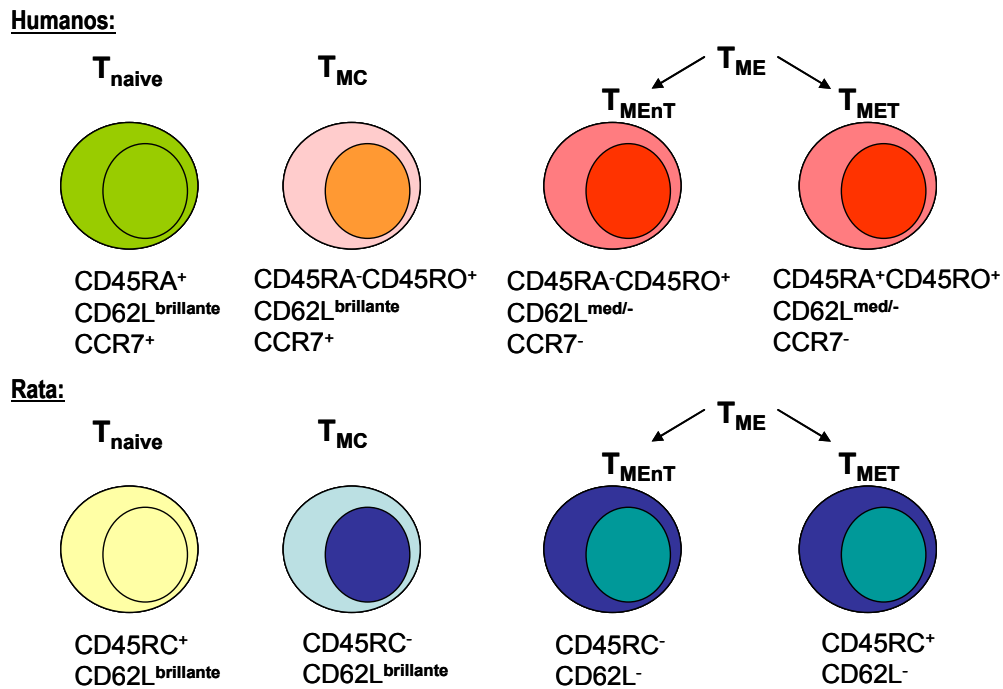


Figura 2. Clasificación de células T según su grado de diferenciación y la especie analizada

1.3. Componentes moleculares del sistema inmune

La comunicación entre los diferentes componentes del sistema inmune se establece mediante contactos intercelulares y moléculas solubles secretadas tanto por las células efectoras como por las APCs. Este componente molecular lo forman el sistema del complemento, las Igs, las citoquinas y las quimioquinas (Nössal, 1987). De todas estas moléculas, prestaremos especial atención a las citoquinas.

Las citoquinas son mediadores solubles no antígeno específicos, liberados principalmente por los leucocitos, y que constituyen una vía esencial de interacción

entre el sistema inmune y el resto del organismo. Participan virtualmente en todas las facetas de la inmunidad, incluyendo, presentación antigénica, reclutamiento, diferenciación, activación e inducción de la expresión de moléculas de adhesión celular. Durante la respuesta inmunológica innata, la activación de células de superficies mucosas y epitelios en respuesta a un antígeno, involucra la producción de citoquinas que permite la amplificación de la respuesta inmunológica y, al ser activadas, tanto las células fagocíticas como las APCs generan nuevas citoquinas efectivas en favorecer la infiltración celular y el daño a los tejidos característicos de la inflamación, como el TNF α e IL-6 (Parkin *et al.*, 2001; Janeway, 2004).

Dentro de los linfocitos T, los principales productores de citoquinas son los linfocitos Th, que se clasifican en función de las citoquinas secretadas. Así, en la respuesta Th1 las citoquinas producidas son IL-2 e IFN γ , mientras que en la respuesta Th2, las células Th producen IL-4 e IL-5. En los procesos patológicos, la IL-12 (producida fundamentalmente por las APCs) y el IFN γ , son imprescindibles en la polarización hacia Th1 y la activación de los macrófagos durante la respuesta inmune frente a patógenos intracelulares (virus y bacterias intracelulares). Así mismo, la señalización mediada por contacto entre linfocitos T estimulados y monocitos durante la presentación antigénica induce la producción de citoquinas proinflamatorias como IL-1 y TNF α . Estos mecanismos proinflamatorios tienen gran relevancia en la patogénesis de desórdenes inflamatorios crónicos. Uno de los mecanismos más importantes es la inducción de citoquinas proinflamatorias como consecuencia de la interacción célula a célula entre linfocitos T estimulados y monocito-macrófagos (Delves *et al.*, 2000 a y b; Kidd, 2003; Janeway, 2004).

El IFN γ es esencial para la activación de la capacidad bactericida de los macrófagos, estimula la producción de IL-1 y TNF α e induce la expresión de moléculas MHC I y MHC II. Tiene un importante papel en la regulación de los procesos inflamatorios y más ampliamente en la respuesta inmune. Regula la extravasación leucocitaria induciendo la expresión de moléculas de adhesión y quimioquinas en leucocitos y células endoteliales, y estimula la producción de óxido nítrico por los macrófagos (Parkin *et al.*, 2001; Janeway, 2004).

El TNF α por su parte, es esencial en los procesos inflamatorios, induce cambios proinflamatorios en células endoteliales, incluyendo producción de otras citoquinas, expresión de moléculas de adhesión, liberación de sustancias procoagulantes e

inducción de la enzima óxido nítrico sintasa inducible (Eigler *et al.*, 1997). El más potente inductor en la producción de esta citoquina es el LPS, a través de la activación de TLR4 en los macrófagos (Chow *et al.*, 1999).

Las quimioquinas constituyen una amplia familia de moléculas con capacidad quimiotáctica implicadas en el tráfico linfocitario y el reclutamiento de linfocitos a los focos inflamatorios e infecciosos. La migración de una célula a su lugar de destino requiere la expresión secuencial de varios quimiorreceptores en respuesta a diferentes gradientes de quimioquinas. Durante la respuesta inmune, tanto las APCs (monocitos, DCs y células B) como los linfocitos T expresan un patrón secuencial de quimiorreceptores que guían su extravasación a órganos linfoides, controlando su maduración y posterior activación (Sallusto *et al.*, 2000b; Parkin *et al.*, 2001)

El sistema del complemento agrupa un gran número de proteínas plasmáticas que reaccionan en cascada e interaccionan con anticuerpos unidos a antígeno y receptores de superficie colaborando en la eliminación de agentes patógenos. Algunos componentes del complemento tienen actividad quimiotáctica y provocan una respuesta inflamatoria local que favorece el reclutamiento y recirculación de APCs y contribuye al inicio de la respuesta inmune adaptativa. Los componentes finales de la cascada del complemento forman poros en la membrana del agente patógeno originando su lisis directa (Parkin *et al.*, 2001; Janeway, 2004).

2. Anatomía y funciones del hígado

2.1. Anatomía

El hígado se interpone anatómicamente entre la corriente sanguínea portal proveniente del intestino y la circulación sistémica. Es el único órgano de la cavidad abdominal que tiene un doble sistema de aporte sanguíneo, la vena porta y la arteria hepática. La vena porta es el tronco final formado por la unión de las venas esplénica y mesentérica, y conduce al hígado toda la sangre procedente del bazo, el páncreas, el estómago, el duodeno, el intestino y el mesenterio. La arteria hepática procede del tronco celíaco. Estos grandes troncos sanguíneos penetran en el hígado por el hilio hepático, donde cada uno de ellos se divide sucesivamente en ramas cada vez más pequeñas que terminan en una red vascular común, el sinusoides hepático, donde la sangre procedente de ambos sistemas se mezcla. En el mismo hilio hepático se halla

también la confluencia de los conductos biliares hepáticos que forman el conducto hepático común. Los vasos linfáticos intrahepáticos terminan en los ganglios de drenaje hepático (GLH) y abocan luego al conducto torácico. Esta peculiar configuración anatómica tiene importantes implicaciones fisiológicas (Bosch, 2009; Terés *et al.*, 2009b).

La unidad estructural y funcional del hígado es el ácino. Cada ácino está centrado por un espacio porta, con una rama portal y una arterial, que aportan sangre a los sinusoides de distintos lobulillos, con las venas centrolobulillares dispuestas en la periferia (Rappaport *et al.*, 1983). En el estudio histológico del hígado el concepto de ácino facilita la comprensión de los mecanismos patogénicos responsables de las lesiones hepáticas.

2.2. Funciones

El hígado es un órgano que regula, distribuye, recicla y almacena nutrientes para que otros tejidos puedan utilizarlos adecuadamente. Se halla implicado en la mayoría de los procesos metabólicos del organismo, como la regulación de la glucemia, la síntesis de urea y de proteínas plasmáticas y la detoxificación, ya sea de compuestos resultantes del propio metabolismo celular, como de aquellos ajenos al organismo con los que entra en contacto a través de los alimentos o el medio ambiente (Castell *et al.*, 2002; Kasper *et al.*, 2004; Terés *et al.*, 2009b). El hígado también tiene importantes funciones en la respuesta inmune al participar en la eliminación de patógenos y/o antígenos de la sangre, así como en la tolerancia de los antígenos derivados del tracto gastrointestinal que entran en el hígado vía portal, y en la contención de la respuesta inmune sistémica de los antígenos de la circulación sistémica que entran en el hígado vía arterial (Knolle *et al.*, 2000).

Las funciones metabólicas y de síntesis de sustancias son efectuadas principalmente por los hepatocitos, que son el componente celular más numeroso del hígado y se disponen en forma de cordones unicelulares o trabéculas entre los sinusoides. Las células estrelladas, o células de Ito, situadas entre los sinusoides y los hepatocitos, tiene como función fisiológica almacenar vitamina A, pero, tras determinados estímulos, adquieren la capacidad de fabricar tejido fibroso, desorganizando la arquitectura vascular normal del hígado. Los colangiocitos forman la pared de los conductos biliares, y constituyen un sistema de canales por donde circula la bilis hasta

llegar al intestino. Por último, las células de Kupffer, macrófagos especializados situados en la pared de los sinusoides, tienen como función principal fagocitar patógenos extraños al organismo, pero también tienen la capacidad de eliminar antígenos solubles circulantes, inmunocomplejos y endotoxina; intervienen en el metabolismo de los esteroides y de diversos fármacos; pueden sintetizar urea, aclarar colesterol del plasma, secretar proteasas y factores estimulantes de la leucopoyesis, así como radicales de oxígeno activos y diversos mediadores, como TNF, IFN y ecosanoides (Kasper *et al.*, 2004; Terés *et al.*, 2009b).

2.2.1. Función metabólica

- *Metabolismo de los hidratos de carbono*: el hígado es capaz de regular de manera muy eficaz los valores de glucosa en sangre manteniendo sus valores constantes. Esto lo consigue, por una parte, mediante su capacidad de almacenamiento de glucosa en forma de glucógeno (glucogenogénesis) y, por la otra, gracias a su rápida respuesta a estímulos hormonales para movilizar glucógeno (glucógenolisis). Así mismo, en ausencia de glucosa es capaz de transformar los aminoácidos y los lípidos en glucógeno (glucogenoneogénesis), (Terés *et al.*, 2009b).

- *Metabolismo de los lípidos*: el hígado posee la capacidad de oxidar, sintetizar, acumular y facilitar el transporte de los lípidos. Sintetiza ácidos grasos que se destinan a la oxidación como fuente de energía para el metabolismo celular, la esterificación del colesterol hepático, la síntesis de fosfolípidos y la resíntesis de triglicéridos para su depósito y para su secreción al plasma. El colesterol hepático se destina a la incorporación en la estructura de las membranas celulares hepáticas, a la excreción por la bilis, a la esterificación para su almacenamiento como colesterol esterificado y al catabolismo de las sales biliares, indispensables para la absorción intestinal de las grasas e imprescindibles, a su vez, en la absorción del colesterol procedente de la dieta (Castell *et al.*, 2002; Terés *et al.*, 2009b).

- *Metabolismo de los aminoácidos y proteínas*: en condiciones normales el hígado cataboliza más de la mitad de los aminoácidos exógenos, procedentes de la hidrólisis de las proteínas y de los péptidos alimentarios, transformándolos en urea. Al mismo tiempo, es uno de los reservorios más importantes de aminoácidos libres, de este modo se asegura la síntesis de las proteínas que emplea para su propia estructura y función secretora, de las enzimas de membrana, cuya continua renovación permite

regular numerosas reacciones metabólicas, y de todas las proteínas plasmáticas. Ocupa un papel central en la síntesis de proteínas, tanto las de transporte como las proteínas estructurales de los distintos tejidos, siendo el responsable de la síntesis de la mayoría de los factores de coagulación (Terés *et al.*, 2009b).

- *Metabolismo de las sales biliares*: la producción de bilis por los hepatocitos es una de las funciones principales del hígado. Los principales solutos orgánicos de la bilis son las sales biliares, fosfolípidos y colesterol no esterificado. En menor proporción contiene también bilirrubina conjugada y proteínas. La formación de bilis cumple importantes funciones. Por un lado, es esencial para la excreción de varios productos catabólicos, como los pigmentos biliares y los metabolitos de hormonas esteroideas, y es también el vehículo para la eliminación de muchos fármacos y toxinas. Por otro lado, los ácidos biliares participan en la digestión de la grasa, cuya solubilización micelar facilita la absorción intestinal. La bilis aporta también Ig A al intestino. Por último, tanto la formación de la bilis en los hepatocitos como la circulación enterohepática de ácidos biliares desempeñan un papel fundamental en la homeostasia del colesterol del organismo. (Castell *et al.*, 2002; Ros, 2009).

- *Metabolismo de la bilirrubina*: componente habitual de la bilis, proviene en su mayor parte de la degradación del grupo hemo de la hemoglobina de los hematíes circulantes maduros que son destruidos en el sistema retículoendotelial (células mononucleares fagocíticas del bazo, hígado y médula ósea). Otra pequeña parte proviene del catabolismo de hemoproteínas tisulares como los citocromos, en particular el citocromo P450 (Terés *et al.*, 2009b).

- *Metabolismo de los fármacos*: el tiempo de actividad de muchos fármacos está limitado por su conversión en metabolitos inactivos. Sin la presencia de determinados sistemas enzimáticos hepáticos, que convierten los fármacos liposolubles (no polares) en sustancias hidrosolubles (polares), ciertos agentes farmacológicos actuarían en el organismo durante mucho tiempo, ya que la hidroinsolubilidad determina que no puedan eliminarse por la orina. Por otra parte, la acumulación excesiva de sustancias no polares produce lesiones, de gravedad variable, en la mayoría de los órganos. Hay muchos factores que influyen en el metabolismo hepático de los fármacos, como la edad, el sexo, la excreción biliar, la circulación enterohepática, la flora intestinal, el estado nutricional y ciertas hormonas. En ocasiones los compuestos conjugados

pueden ser más tóxicos que el metabolito activo o que el propio producto orgánico inicial (Terés *et al.*, 2009b).

2.2.1. Función inmunitaria

La función fisiológica del hígado, ya sea la síntesis de proteínas, el metabolismo o la eliminación de patógenos y de antígenos de la sangre, requiere una respuesta inmune que se adapte a estas tareas y se regule a nivel local. Por ello el hígado tiene importantes funciones en la respuesta inmune innata y adquirida. La contribución hepática a la respuesta innata del sistema inmune incluye la producción de proteínas de fase aguda o la eliminación de patógenos y/o antígenos de la sangre. La participación hepática en la respuesta inmune adquirida incluye la eliminación de las células T activadas por apoptosis o la inducción de tolerancia frente a antígenos, ya sean propios o de la dieta. Por tanto, mientras que los microorganismos patógenos y los antígenos de la circulación sistémica que entran en el hígado con la sangre arterial deben ser eliminados de manera eficiente, el gran número de antígenos derivados del tracto gastrointestinal que entran en el hígado con la sangre venosa deben ser tolerizados. Pero los mecanismos que determinan el balance entre tolerancia e inmunidad todavía no están claros (Knolle *et al.*, 2000; Bowen *et al.*, 2004).

Un hígado sano contiene un importante número de células fagocíticas, de APCs y de linfocitos, además es un sitio donde se producen citoquinas, componentes del complemento y proteínas de fase aguda (Doherty *et al.*, 2000). Las proteínas de fase aguda son proteínas producidas por el hígado en respuesta a una estimulación por citoquinas. La circulación sistémica de estas proteínas es la responsable de muchos de los efectos sistémicos de la respuesta inflamatoria. Brevemente, un daño local extrahepático promueve la liberación por parte de los macrófagos locales de una primera oleada de citoquinas como IL1, TNF α e IL6. El efecto de estas citoquinas sobre las células adyacentes provoca la liberación, por parte de estas células, de una segunda oleada de IL6, que provoca la producción masiva de proteínas de fase aguda por parte de los hepatocitos (Parker *et al.*, 2005).

Las células de Kupffer, situadas sobre todo en sitios donde la sangre entra en el hígado, es decir, en la zona periportal, limpian la sangre de antígenos, microorganismos patógenos o endotoxina, por fagocitosis, y secretan como respuesta varias citoquinas, incluyendo TNF α y grandes cantidades de IL6. Como resultado de

este proceso eficiente, el hígado raramente se infecta con bacterias y contribuye a la eliminación de infecciones bacterianas sistémicas. Los mecanismos de eliminación de patógenos son rápidos y se complementan entre sí, requisito previo importante para luchar contra los patógenos y evitar la infección (Knolle *et al.*, 2000; Kita *et al.*, 2001).

Pero hay muchos patógenos que se replican dentro de los hepatocitos y una vez que han infectado a estos no pueden ser controlados por las células de Kupffer, las células NK o los leucocitos circulantes. Por lo tanto, al infectar los hepatocitos, los patógenos son protegidos de la respuesta inmune. En esta situación, las células endoteliales del sinusoide hepático y demás APCs deberán captar los antígenos liberados por el hepatocito dañado y presentarlos a las células T. Sólo cuando las células T se activen tendrá lugar una respuesta inmunitaria específica contra los hepatocitos con infiltración de células T y el desarrollo de una hepatitis (Knolle *et al.*, 2000).

Investigaciones recientes en ratones parecen demostrar que el sitio donde se produce la activación de las células T es determinante para el balance entre inmunidad y tolerancia intrahepática. Así, las células T CD8 novatas que se activen en los ganglios linfáticos desarrollarán una respuesta citotóxica eficiente, mientras que aquellas células que se activen dentro del hígado presentarán una respuesta citotóxica incapaz de mediar el daño celular, con lo que se eliminarán por apoptosis dentro del propio hígado (Bowen *et al.*, 2004).

Una característica importante de los linfocitos T hepáticos es que la mayoría expresan marcadores de activación. Este estado crónicamente activado de muchos de los linfocitos T hepáticos podría apoyar la hipótesis de que estas células están continuamente actuando como centinelas, mediando el mantenimiento de la homeostasis inmune induciendo respuestas inmunogénicas y tolerogénicas. (Doherty *et al.*, 2000; Bowen *et al.*, 2004).

A pesar de la respuesta inmune frente a patógenos, el hígado favorece la inducción de la tolerancia más que la inmunidad. La tolerancia se define como el estado normal esencial o la ausencia de respuesta inmune a los componentes nocivos del propio cuerpo (Kita *et al.*, 2001). Los fenómenos de tolerización hepáticos se producen en varias situaciones y están mediados por distintos mecanismos, ya sea i) ignorar o prevenir el contacto entre el linfocito y el antígeno, por ejemplo, mediante la eliminación clonal por apoptosis de células T efectoras específicas ii) la anergia y/o supresión mediante la

deprivación de las señales coestimuladoras necesarias para que se induzca la respuesta inmune, y iii) la regulación de la función efectora de los linfocitos gracias a la capacidad que poseen los denominados linfocitos supresores de cortar o inhibir la inducción de la respuesta efectora (Knolle *et al.*, 2000; Kita *et al.*, 2001).

Respecto a los fenómenos de tolerización frente a antígenos de la dieta, el LPS parece ser uno de los factores más importantes. De hecho, estudios en ratones que no responden al LPS han demostrado que se pierde la tolerancia (Kiyono *et al.*, 1982). El LPS parece ser un factor importante en el microambiente local de hígado e intestino dado que los antígenos derivados del tracto gastrointestinal están acompañados generalmente de LPS. Estudios recientes han demostrado cómo la estimulación repetida a células de Kupffer y células endoteliales del sinusoides con bajas dosis de LPS provocan un estado refractario caracterizado por la disminución de moléculas de adhesión, esenciales para los leucocitos, en la membrana de dichas células endoteliales, lo que contribuye al control hepático de la inflamación. No obstante, un incremento de la concentración de LPS rompe dicha tolerancia activando los mecanismos de respuesta al estímulo inflamatorio (Uhrig *et al.*, 2005).

Por todo ello, las alteraciones en la estructura o la función hepática pueden dar lugar a alteraciones significativas, tanto en el sistema inmune innato como en el adaptativo (Parker *et al.*, 2005).

3. Cirrosis hepática: definición y complicaciones

3.1. Definición y estadios de la cirrosis

La cirrosis es el proceso patológico común donde convergen muchos tipos de enfermedades crónicas hepáticas. Las características patológicas reflejan el daño irreversible crónico del parénquima hepático e incluyen fibrosis extensa en asociación con la formación de nódulos de regeneración, que definen la enfermedad histológicamente (**Figura 3**). No obstante, la cirrosis es una entidad clínica definida por un espectro de manifestaciones clínicas características (Kasper *et al.*, 2004; Ginés *et al.*, 2009).

La acumulación de proteínas de la matriz extracelular distorsionan la arquitectura hepática, formando cicatrices fibrosas y el consiguiente desarrollo de nódulos de regeneración que definen la cirrosis. El proceso pasa por diferentes etapas

histológicas que se han clasificado de diferentes maneras, pero la clasificación más empleada en la actualidad es la METAVIR, que la clasifica la fibrosis en 4 etapas, que van desde la F0, que representa la falta de fibrosis; F1, fibrosis portal; F2, fibrosis periportal; F3 con puentes de fibrosis; hasta la F4, con nódulos de regeneración. En este contexto, una vez que se alcanza la última etapa, la cirrosis queda establecida y el proceso se considera finalizado desde el punto de vista patológico (Bataller *et al.*, 2005; García-Tsao *et al.*, 2010).

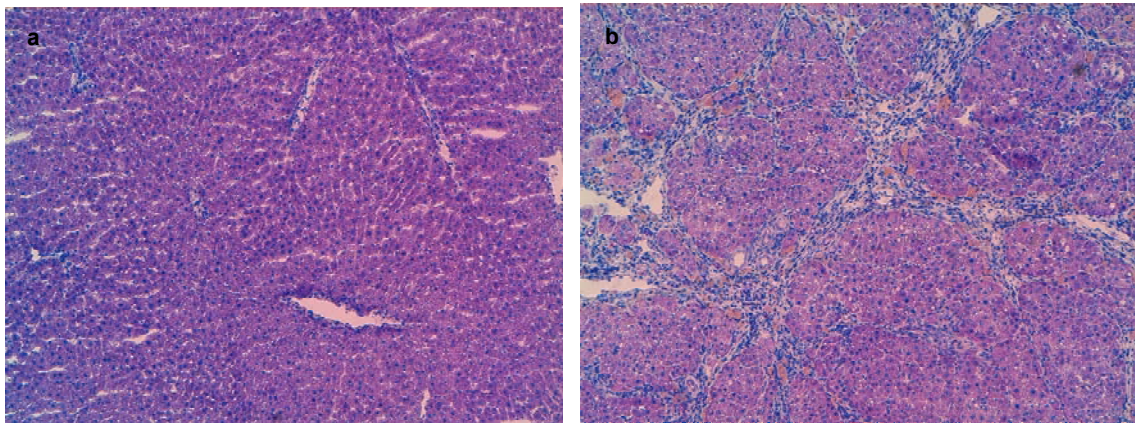


Figura 3. Imagen histológica de un hígado de rata sano (a) y otro cirrótico (b). Tinción con Hematoxilina-Eosina (100x). En la figura a se aprecia la estructura organizada en cordones de los sinusoides hepáticos mientras que en la figura b las anchas fibras de colágeno desorganizan la arquitectura dando paso a los nódulos de regeneración.

Desde el punto de vista morfológico, la cirrosis se divide en tres tipos, según el tamaño de los nódulos de regeneración. Así, en la cirrosis micronodular el tamaño de los nódulos es regular y tiene menos de 3 mm de diámetro. La cirrosis macronodular se caracteriza por la presencia de septos y nódulos que difieren en el tamaño pero muchos de ellos superan los 3 mm de diámetro. Por último, la cirrosis mixta presenta la misma proporción de micro y macronódulos (Anthony *et al.*, 1977).

Desde el punto de vista clínico, se distingue entre cirrosis compensada y descompensada, dos etapas con diferentes características, pronóstico y esperanza de vida (D'Amico *et al.*, 2006). El término de cirrosis hepática compensada se aplica cuando la enfermedad no ha desarrollado ninguna de las complicaciones clínicas propias de la cirrosis, o más concretamente cuando no ha desarrollado la formación de ascitis (Bruguera *et al.*, 2001; D'Amico *et al.*, 2006). Dentro de esta fase se han identificado a su vez

dos subpoblaciones en función de la presencia o no de varices, cada una con diferente pronóstico (**Figura 4**), (García-Tsao *et al.*, 2010).

A medida que la lesión progresa, se distorsiona cada vez más la arquitectura hepática, se produce la disfunción hepatocitaria y el incremento en la resistencia al flujo sanguíneo, lo que provocan la insuficiencia metabólica hepática y la hipertensión portal, respectivamente (Popper *et al.*, 1977; Rappaport *et al.*, 1983; Bataller *et al.*, 2005). Las complicaciones clínicas derivadas de la hipertensión portal (ascitis, hemorragia por varices, encefalopatía hepática) o la insuficiencia hepática (ictericia) son las que definen la cirrosis descompensada y predicen habitualmente una importante disminución de la supervivencia, y un mal pronóstico a corto plazo (García-Tsao *et al.*, 2010).

La cirrosis es, por tanto, un proceso complejo, con múltiples cambios morfológicos, funcionales, hemodinámicos y clínicos que provocan la transición desde la cirrosis compensada a la descompensada y que necesita una clasificación fisiopatológica más refinada (**Figura 4**).

Histological	F1-F3		F4 (Cirrhosis)	
Clinical	Non-cirrhotic	Compensated	Compensated	Decompensated
Symptoms	None	None (no varices)	None (varices present)	Ascites, VH, Encephalopathy
Sub-stage	-	Stage 1	Stage 2	Stages 3 and 4
Hemodynamic (HVPG, mmHg)		>6	>10	>12
Biological	Fibrogenesis and Angiogenesis	Scar and X-linking	Thick (acellular) scar and nodules	Insoluble scar

Figura 4. Clasificación de la enfermedad hepática crónica según parámetros histológicos, clínicos, hemodinámicos y biológicos (Imagen extraída de García-Tsao *et al.*, 2010).

3.2. Complicaciones de la cirrosis

3.2.1. Insuficiencia hepática: La insuficiencia hepática se produce como consecuencia de la necrosis de las células hepáticas y se define como la incapacidad del hígado para llevar a cabo su función sintética y metabólica (Terés *et al.*, 2009a).

Fisiopatológicamente se caracteriza por alteraciones en el almacenamiento de glucógeno que producen hipoglucemia, alteraciones en el metabolismo de las grasas como hipocolesterolemia, acidosis metabólica, trastornos en la síntesis de factores de coagulación que aumentan la tendencia al sangrado, hipoalbuminemia que conlleva alteraciones en la presión osmótica, alteraciones en la capacidad para sintetizar y secretar la bilis que provocan ictericia, alteraciones de la función fagocítica de las células de Kupffer que derivan en complicaciones infecciosas generalmente por bacterias Gram negativas de origen intestinal. Por último, al fallar la función detoxificadora hepática, también se producen alteraciones en la función cerebral (encefalopatía hepática), (Terés *et al.*, 2009a).

3.2.2. Hipertensión portal: La hipertensión portal es la primera y más importante consecuencia de la cirrosis y está detrás de la mayoría de las complicaciones clínicas de la enfermedad. Se define como el incremento de la presión hidrostática en el interior del sistema venoso portal. Este incremento determina que el gradiente de presión entre la vena porta y la vena cava se eleve por encima del rango normal. El aumento sostenido de la presión portal ocasiona el desarrollo de circulación colateral, que deriva una parte del flujo sanguíneo portal a la circulación sistémica, sin pasar por el hígado (cortocircuito o shunt portosistémico), y que incluye las varices esofágicas (Bosch, 2009).

La trascendencia de este síndrome, muy frecuente en el curso de las enfermedades crónicas del hígado, está determinada por sus graves consecuencias, pero las manifestaciones clínicas dependen, en parte, del nivel del territorio portal en el que se localice la lesión y van desde la aparición de varices esofágicas, esplenomegalia y/o hiperesplenismo y ascitis (con o sin peritonitis bacteriana espontánea), hasta la pérdida de la función neurológica por encefalopatía hepática (Bosch, 2009).

Cuando existe hipertensión portal, una proporción sustancial del flujo portal no llega al hígado, puesto que es derivado a la circulación sistémica a través de una extensa red de colaterales. El aumento de la presión portal promueve la formación de esta

circulación colateral portosistémica, y aparece un importante incremento del flujo sanguíneo, que contribuye a agravar la hipertensión portal impidiendo que la presión portal disminuya a pesar de la formación de colaterales. La elevación del flujo sanguíneo portal se debe a una vasodilatación esplácnica, ocasionada por la activación de factores endógenos, como el óxido nítrico, prostaciclina y glucagón, entre otros. Así mismo, la excesiva producción de vasodilatadores determina una reducción de la sensibilidad vascular a vasoconstrictores endógenos, lo que explica que con frecuencia exista una marcada vasodilatación a pesar de la activación de los sistemas vasoconstrictores (Bosch, 2009).

El factor inicial que provoca la aparición de hipertensión portal en cirrosis es un aumento de la resistencia vascular. Pero esta no es una consecuencia fija e irreversible, sino que tiene un componente dinámico, susceptible de ser modificado por sustancias endógenas y fármacos vasoactivos. Un aumento del tono adrenérgico y una producción insuficiente de óxido nítrico en la microcirculación hepática pueden aumentar considerablemente la resistencia vascular hepática en la cirrosis. La resistencia vascular porto-colateral también es sensible a estímulos vasoactivos. Este concepto constituye la base para el uso de vasodilatadores en el tratamiento de la hipertensión portal (Bosch, 2009).

4. Cirrosis hepática y sistema inmune

4.1. Implicación del sistema inmune en la patogenia de la fibrogénesis hepática

La fibrosis hepática es el resultado de un daño crónico del hígado junto con la acumulación de proteínas de la matriz extracelular, que es característico de muchos tipos de enfermedades hepáticas crónicas. Históricamente se pensaba que la fibrosis hepática era un proceso pasivo e irreversible debido al colapso del parénquima hepático y su sustitución con tejido rico en colágeno, pero actualmente este proceso se considera un modelo de cicatrización de heridas en respuesta a una lesión crónica del hígado. Esta fibrosis hepática progresa rápidamente hacia la cirrosis en múltiples circunstancias clínicas, de ahí la importancia del estudio de su patogenia, diagnóstico y tratamiento (Bataller *et al.*, 2005). Por tanto, la respuesta cicatricial en el hígado representa una respuesta nociva en lugar de una respuesta beneficiosa en la regeneración hepática (Aoyama *et al.*, 2010).

Durante el proceso de fibrogénesis se produce una compleja interacción entre los diferentes tipos celulares hepáticos. Los hepatocitos son el objetivo para la mayoría de agentes hepatotóxicos (virus, alcohol, ácidos biliares...) y, una vez dañados, liberan citoquinas inflamatorias y otros factores solubles que inducen la activación de las células de Kupffer y estimulan el reclutamiento de células T activadas desde la sangre. Este ambiente inflamatorio estimula a su vez a las células estrelladas hepáticas, que se transforman en miofibroblastos. Las células estrelladas activadas secretan a su vez otras citoquinas que perpetúan su estado activado. Si el daño hepático persiste, la acumulación de las células estrelladas y miofibroblastos que secretan colágeno y otras proteínas de la matriz extracelular, conducirán a la cirrosis hepática, al tiempo que expresan moléculas de adhesión y liberan diferentes quimioquinas, modulando la activación de los linfocitos infiltrados (**Figura 5**).

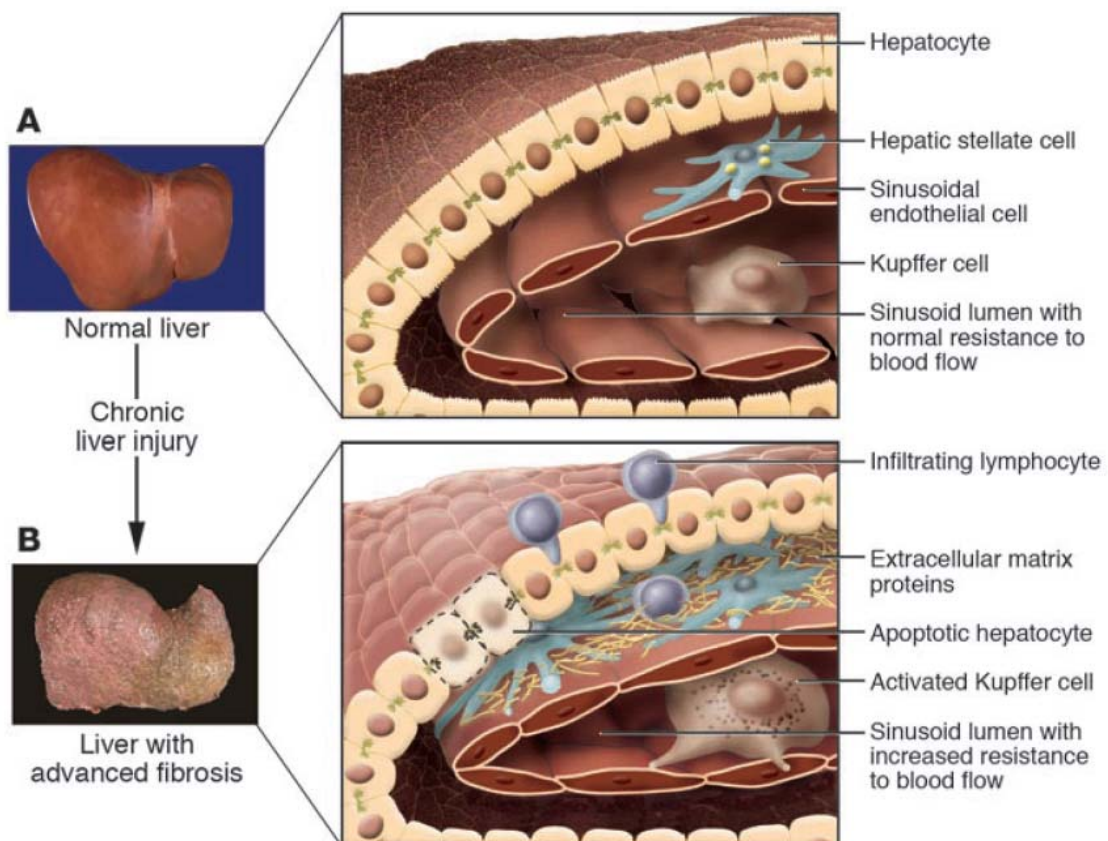


Figura 5. Cambios en la arquitectura hepática (A) asociados a la fibrosis hepática avanzada (B). Imagen extraída de **Bataller et al., 2005**

Se crea por tanto un círculo de retroalimentación en el que las células inflamatorias del sistema inmune estimulan el componente fibrogénico, al tiempo que la fibrosis actúa sobre la subpoblación de linfocitos Th (Bataller *et al.*, 2005). En este sentido se ha demostrado que, incluso cuando ya se encuentra establecida, la cirrosis es un proceso dinámico en el que el sistema inmune se encuentra sometido a una estimulación anormal que pudiera favorecer su participación en la elevada predisposición a infecciones bacterianas, en las alteraciones hemodinámicas o en la respuesta inflamatoria del hígado y de otros órganos (López-Talavera *et al.*, 1997; Muñoz *et al.*, 1999; Wiest *et al.*, 1999a; Albillos *et al.*, 2003).

4.2. Activación sistémica del sistema inmune en la cirrosis hepática

Las citoquinas liberadas por las células del sistema inmune son clave en la regulación de esta respuesta inflamatoria frente a la lesión que modula la fibrogénesis hepática, y esta respuesta inflamatoria se extiende a nivel sistémico. Así, la inflamación precede y promueve la progresión de la fibrosis hepática. (Bataller *et al.*, 2005).

Por ejemplo, MCP1 y RANTES estimulan la fibrogénesis mientras que la IL10 y el IFN γ ejercen el efecto contrario, (Tilg *et al.*, 1993; Shi *et al.*, 1997; Von Baehr *et al.*, 2000; Schwabe *et al.*, 2003). El TGF β , producido masivamente por las células de Kupffer, parece ser un mediador de fibrogénesis, favoreciendo la transformación de las células estrelladas a miofibroblastos, así como estimulando la síntesis y deposición de proteínas de la matriz extracelular, al tiempo que inhibe su degradación (Castilla *et al.*, 1991). Las citoquinas con propiedades vasoactivas también regulan la fibrogénesis hepática, así, las sustancias vasodilatadoras como el óxido nítrico, poseen propiedades antifibróticas, mientras que los vasoconstrictores, como la norepinefrina, poseen el efecto contrario (Chu *et al.*, 1997; Oben *et al.*, 2004). Por su parte, el TNF α desempeña un papel fundamental en el deterioro hemodinámico característico de la cirrosis (Chu *et al.*, 1997; López-Talavera *et al.*, 1997; Muñoz *et al.*, 1999; Wiest *et al.*, 1999b; Albillos *et al.*, 2003).

Diversos estudios en pacientes y en modelos experimentales han constatado la existencia en la cirrosis de un marcado estado proinflamatorio sistémico, manifestado por un aumento de los niveles circulantes de citoquinas proinflamatorias y un incremento en la expresión de antígenos de activación en las diferentes poblaciones celulares del sistema inmune (Tilg *et al.*, 1992; López-Talavera *et al.*, 1997; Muñoz *et al.*, 1999; Wiest *et al.*, 1999a; Albillos *et al.*, 2003; Albillos *et al.*, 2004b; Muñoz *et al.*, 2005; Albillos *et al.*, 2010). De hecho,

las elevadas concentraciones séricas de citoquinas son un hallazgo propio de la cirrosis e independiente de su etiología, aunque dependiente del estadio de la enfermedad (Girón *et al.*, 1992; Tilg *et al.*, 1992; Tilg *et al.*, 1993; Albillos *et al.*, 2003; Albillos *et al.*, 2004b).

Así pues, las fases descompensadas de la enfermedad se caracterizan por un aumento en el nivel sérico de citoquinas proinflamatorias como TNF α , IFN γ , IL-1 β e IL-6 (Tilg *et al.*, 1992; Albillos *et al.*, 2003; Albillos *et al.*, 2004b), de mediadores antiinflamatorios como IL-10, y de los receptores solubles de IL-1 β y de TNF α (sTNFRI y sTNFRII), (Tilg *et al.*, 1993; Von Baehr *et al.*, 2000). Es más, nuestro grupo de investigación ha demostrado en un modelo murino de cirrosis descompensada por CCl₄ que la activación sistémica del sistema inmune se caracteriza por un patrón proinflamatorio consistente en una polarización Th1 con elevada producción de IFN γ (Muñoz *et al.*, 2005).

La cirrosis descompensada se relaciona también con un aumento en la liberación de TNF α y se han identificado los monocitos como las células del sistema inmune responsables del aumento en el nivel circulante de esta citoquina. Los monocitos circulantes de pacientes y modelos animales de cirrosis con ascitis presentan un aumento en la producción espontánea de TNF α (Albillos *et al.*, 2004b; Muñoz *et al.*, 2005). Además, en los pacientes cirróticos se da una correlación directa entre la producción monocitaria y el nivel sérico de esta citoquina (Albillos *et al.*, 2004b) con una sensibilidad aumentada al estímulo con LPS (Devire *et al.*, 1990; Le Moine *et al.*, 1995; Albillos *et al.*, 2004b), lo que se traduce en un aumento aún mayor de la producción de TNF α tras este estímulo.

Estos hallazgos han conducido a proponer el TNF α como la diana molecular sobre la que desarrollar estrategias terapéuticas en cirrosis. Diversos estudios han tratado de reducir los efectos de esta citoquina a nivel sistémico en modelos experimentales de cirrosis e hipertensión portal, inhibiendo su síntesis (López-Talavera *et al.*, 1996; López-Talavera *et al.*, 1997), o mediante el bloqueo de esta citoquina utilizando anticuerpos monoclonales anti-TNF α (Limuro *et al.*, 1997; Muñoz *et al.*, 1999). No obstante, estudios más recientes desarrollados por nuestro grupo de investigación, han demostrado en un modelo experimental de cirrosis por ligadura del conducto biliar, que el tratamiento con AM3, un inmunomodulador biológico que inhibe específicamente el TNF α producido por los monocitos activados por LPS (Brieva *et al.*, 1999; Reyes *et al.*, 2004; De la Hera *et al.*, 2004), no sólo atenúa el estado proinflamatorio sistémico y hepático de las ratas con cirrosis

descompensada, sino que disminuye la fibrosis hepática y revierte parcialmente el estado circulatorio hiperdinámico sin aumentar la susceptibilidad a infecciones bacterianas (Albillos *et al.*, 2010).

4.3. Implicación de la traslocación bacteriana intestinal

Existen numerosas evidencias que indican que la activación del sistema inmune existente en la cirrosis es promovida por los productos bacterianos entéricos. En este sentido se ha demostrado la existencia de una relación entre la activación del sistema inmune y la traslocación de bacterias a los ganglios linfáticos mesentéricos (GLM) (Wiest *et al.*, 1999b; Albillos *et al.*, 2002; Genescá *et al.*, 2003), la reducción de este estado de activación tras la decontaminación intestinal con antibióticos (Runyon *et al.*, 1995; Albillos *et al.*, 2003; Muñoz *et al.*, 2005), y su asociación con un elevado riesgo de infecciones bacterianas espontáneas en los pacientes con elevados niveles plasmáticos de proteína de unión al lipopolisacárido bacteriano (LBP) (Albillos *et al.*, 2004a).

La traslocación bacteriana intestinal (TBI) se define como el proceso por el cual la flora normal del intestino cruza la mucosa intestinal y alcanza los GLM y eventualmente la circulación sistémica (Berg *et al.*, 1979). La frecuencia con la que las bacterias abandonan la luz intestinal y alcanzan los GLM en individuos sanos es baja, pero, aún cuando esto ocurre, el sistema inmune es capaz de eliminar los gérmenes antes de que estos generen una infección. Sin embargo, cuando los individuos se encuentran sometidos a determinadas situaciones de estrés, la frecuencia con la que se da este proceso se ve significativamente aumentada (García-Tsao *et al.*, 1995; Pérez-Páramo *et al.*, 2000; Cirera *et al.*, 2001; Genescá *et al.*, 2003).

Los mecanismos principales que facilitan la TBI son el sobrecrecimiento bacteriano intestinal (SBI), la alteración de la permeabilidad de la mucosa del intestino y un sistema inmune alterado en el territorio esplácnico. En la cirrosis se alteran los tres factores simultáneamente, de ahí que haya mayor incidencia de TBI que en individuos sanos, y que la susceptibilidad a la TBI sea aún mayor que en el caso de estar alterado solamente uno de ellos (Albillos *et al.*, 2001a; Albillos *et al.*, 2002).

En la cirrosis descompensada existe una tasa elevada de TBI y un aumento de la permeabilidad intestinal (Llovet *et al.*, 1998; Pérez-Páramo *et al.*, 2000; Cirera *et al.*, 2001). El paso de productos bacterianos al torrente circulatorio, como se observa por la presencia de ADN bacteriano (ADNbact) en suero o el incremento de LBP, sólo ha sido demostrado

en pacientes con cirrosis descompensada (Such *et al.*, 2002; Albillos *et al.*, 2003; Albillos *et al.*, 2004a; González-Navajas *et al.*, 2008). De forma similar, la TBI a GLM, sólo ha sido descrita en pacientes y modelos experimentales de cirrosis con ascitis (Runyon *et al.*, 1994; García-Tsao *et al.*, 1995; Pérez-Páramo *et al.*, 2000; Genescá *et al.*, 2003; Albillos *et al.*, 2005; Guarner *et al.*, 2006). De hecho, se ha comprobado que las ratas cirróticas necesitan desarrollar ascitis para presentar una TBI eficiente (Wiest *et al.*, 1999a). Un estudio reciente de nuestro grupo utilizando un modelo experimental de cirrosis con ascitis, ha demostrado que la activación de las células del sistema inmune en las ratas cirróticas se inicia en el GLM en respuesta al paso de estas bacterias, y posteriormente, impacta a nivel sistémico por recirculación de estas células (Muñoz *et al.*, 2005).

El incremento de los niveles de LPS en la sangre portal debido al paso de las bacterias entéricas activa a las células de Kupffer a través de su interacción con el TLR4 lo que estimula la producción de $\text{TNF}\alpha$ (Bataller *et al.*, 2005). Estudios recientes ponen de manifiesto el papel de la señalización vía TLR en la fibrosis hepática, en concreto, la participación de TLR4 y TLR9 (Aoyama *et al.*, 2010). El TLR4, que reconoce el LPS de la pared de bacterias Gram negativas, se expresa en altos niveles tanto en las células de Kupffer como en las células estrelladas, y la activación de ambos tipos celulares se asocia con la progresión de la fibrosis. De hecho, el daño hepático inducido mediante la ligadura del colédoco o el tratamiento crónico con tetracloruro de carbono (CCl_4) o tioacetamida en ratones mutantes para TLR4 provoca menos inflamación hepática y fibrosis que en los ratones salvajes (Seki *et al.*, 2007).

El TLR9 por su parte, reconoce secuencias de ADNbact no metilados y se expresa en las células estrelladas. Estudios previos han demostrado la existencia de niveles elevados de ADNbact en el plasma y el líquido ascítico tanto de pacientes como de modelos animales de cirrosis (Such *et al.*, 2002; Francés *et al.*, 2004; Guarner *et al.*, 2006) y recientemente se ha comprobado que el ADN desnaturalizado derivado de hepatocitos apoptóticos induce la diferenciación de las células estrelladas a través del TLR9, provocando respuestas fibrogénicas al elevar los niveles de ARN mensajero de $\text{TGF}\beta$ y colágeno tipo I (Watanabe *et al.*, 2007). Ambos datos en conjunto sugieren que el ADN, ya sea de origen bacteriano como el derivado de los hepatocitos apoptóticos, participan en la progresión de la fibrosis hepática como ligandos del TLR9 (Aoyama *et al.*, 2010).

JUSTIFICACIÓN E HIPÓTESIS

La cirrosis hepática es una enfermedad en cuya patogenia se han implicado mecanismos mediados por el sistema inmune con activación de sus componentes celulares y producción de citoquinas proinflamatorias. En concreto, nuestro grupo ha demostrado en cirrosis descompensada experimental, que la translocación de bacterias o de sus productos desde la luz intestinal a los ganglios linfáticos mesentéricos, estimula a los brazos innato y adquirido del sistema inmune a dicho nivel, y que la expansión y recirculación de estas células activadas extiende la inflamación a nivel sistémico.

A pesar del papel fundamental que desempeña la activación sistémica en la cirrosis, se desconoce si estas anomalías ya existen en fases anteriores, pre-ascíticas, de la enfermedad, y qué relevancia patogénica desempeña el hígado, órgano diana de la inflamación en cirrosis, en la fase compensada de la enfermedad, en la que no se ha descrito la existencia de traslocación bacteriana intestinal.

Por estas razones nos propusimos caracterizar y comparar las alteraciones en la distribución y el estado de activación de diferentes poblaciones y subpoblaciones celulares del sistema inmune en distintos compartimentos anatómicos (sangre periférica, hígado, ganglio linfático hepático y ganglio linfático mesentérico) de ratas con cirrosis compensada inducida con CCl₄, con objeto de investigar si existe activación sistémica del sistema inmune inflamatorio y, si así fuera, establecer el compartimento preferente en el que se produce esta activación. Además, y con objeto de estudiar la contribución patogénica del estímulo bacteriano de origen entérico, evaluamos la existencia de traslocación bacteriana intestinal en esta fase de la cirrosis, su posible participación en la activación del sistema inmune sistémico y el efecto de la decontaminación bacteriana intestinal sobre dichas alteraciones.

Nuestra hipótesis establece que la activación sistémica del sistema inmune inflamatorio ya se encuentra presente en la fase compensada, pre-ascítica, de la cirrosis, y que a su inducción contribuyen, fundamentalmente, las células inmunitarias activadas en los ganglios de drenaje hepático y/o intestinal.

OBJETIVOS

El objetivo general de este trabajo es determinar si existe activación del sistema inmune inflamatorio a nivel sistémico en ratas con cirrosis compensada (pre-ascítica) inducida por CCl₄ y, si así fuera, identificar el territorio en el que se inicia tal activación.

Para alcanzar este objetivo general, nos planteamos los siguientes objetivos específicos en este modelo experimental:

1. Caracterizar la distribución y el estado de activación de las poblaciones de células inmunitarias en la sangre periférica.
2. Caracterizar y comparar la distribución y el estado de activación de las poblaciones de células inmunitarias en el hígado, el ganglio linfático hepático y el ganglio linfático mesentérico, y comparar los hallazgos con los observados en la sangre periférica.
3. Evaluar la existencia de traslocación bacteriana intestinal en esta fase de la cirrosis.
4. Investigar la implicación de las bacterias o productos bacterianos de origen intestinal en la patogenia de las alteraciones de las células del sistema inmune.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Modelo experimental

En el estudio se emplearon un total de 95 ratas Wistar macho suministradas por el Centro de Experimentación Animal de la Universidad de Alcalá. Los animales se estabularon en jaulas tipo III, con aire ultrafiltrado mediante filtros HEPA y se sometieron a un ambiente controlado con temperatura constante de $21 \pm 2^{\circ}\text{C}$, humedad relativa de $55 \pm 5\%$ y 12 horas de ciclo luz/oscuridad. Además, se les permitió libre acceso al agua y a dieta estándar.

La inducción de cirrosis se realizó mediante la administración intragástrica semanal de tetracloruro de carbono (CCl_4 , Carlo Erba, Farmitalia, Milán, Italia) de acuerdo con el modelo previamente descrito (Proctor *et al.*, 1982) y modificado por Runyon *et al.* (Runyon *et al.*, 1991). Desde una semana antes del inicio de la administración de CCl_4 , y durante todo el tratamiento, los animales recibieron fenobarbital (Química Farmacéutica Bayer, Barcelona, España) en el agua de bebida (35 mg/dl) para acelerar el desarrollo de la cirrosis. La dosis de CCl_4 se administró con una sonda intragástrica, e inicialmente fue de 20 μl , y se incrementó semanalmente en función de la pérdida de peso causada por la dosis previa, con el objetivo de obtener una respuesta más homogénea al hepatotóxico (Proctor *et al.*, 1982).

La mortalidad del modelo en las fases iniciales de inducción de cirrosis fue de un 38%, lo que coincide con lo descrito previamente (Casafont *et al.*, 1997). La administración de CCl_4 se mantuvo entre 10 y 14 semanas para asegurar la aparición de cirrosis en ausencia de ascitis (Clària *et al.*, 2005; Constandinou *et al.*, 2005). Los experimentos se realizaron una semana después de la administración de la última dosis de CCl_4 y fueron llevados a cabo de acuerdo con lo establecido en la Guía para el Cuidado y la Utilización de Animales de Laboratorio de la Universidad de Alcalá.

2. Diseño experimental

El estudio se estructuró en 2 protocolos:

2.1. Protocolo I

El objetivo de este protocolo fue determinar si el estado inflamatorio sistémico que caracteriza a la cirrosis con ascitis está presente antes de la aparición de ésta y establecer la fuente u origen de dicha inflamación. Para ello realizamos un análisis

comparativo del fenotipo y el estado de activación de las células mononucleares de sangre periférica, ganglio linfático mesentérico más cercano al ciego (GLM), ganglios linfáticos de drenaje hepático (GLH) e hígado.

La cirrosis se indujo mediante el protocolo previamente descrito (Runyon *et al.*, 1991; Pérez-Páramo *et al.*, 2000) a un grupo de 45 ratas con un peso inicial de 120-160g durante una media de 12 semanas, para asegurar que la cirrosis hepática se hubiera establecido en ausencia de ascitis (Clària *et al.*, 2005). Como grupo control se utilizaron 20 ratas pareadas en edad y sexo que únicamente recibieron fenobarbital en el agua de bebida durante 10-14 semanas (Figura 6).

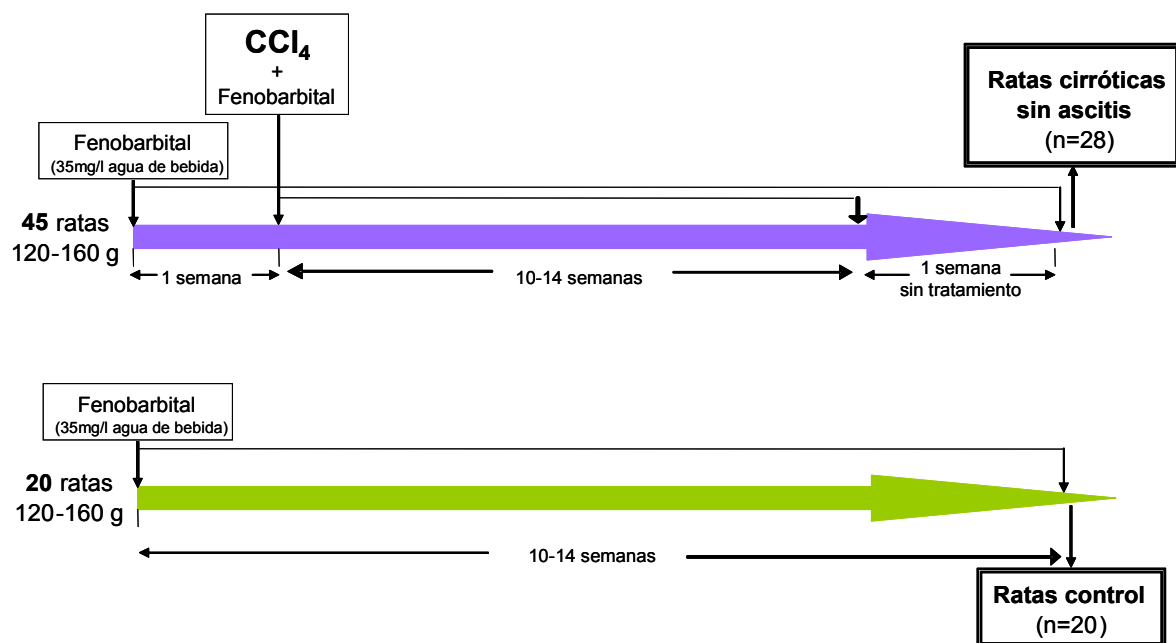


Figura 6. Diseño experimental del protocolo I.

2.2. Protocolo II

El objetivo de este protocolo fue investigar el impacto de la decontaminación de las bacterias de la flora intestinal en el estado de activación del sistema inmune en la cirrosis compensada. Para desarrollar este objetivo se utilizaron 18 ratas con cirrosis sin ascitis (Runyon *et al.*, 1991; Pérez-Páramo *et al.*, 2000), y se dividieron en 2 grupos. El primer grupo, de 7 ratas, recibió durante 2 semanas antibióticos orales no absorbibles de amplio espectro frente a bacterias aerobias. Los antibióticos utilizados se disolvieron en el agua de bebida, y fueron norfloxacin (10mg/kg/día; Sigma-Aldrich., St. Louis,

MO), y vancomicina (16mg/día; Sigma-Aldrich). Al segundo grupo, de 7 ratas, se les administró agua durante 2 semanas y constituyó el grupo control (**Figura 7**). A lo largo de todo el protocolo las ratas continuaron recibiendo semanalmente la dosis de CCl₄ hasta una semana antes de la realización del experimento.

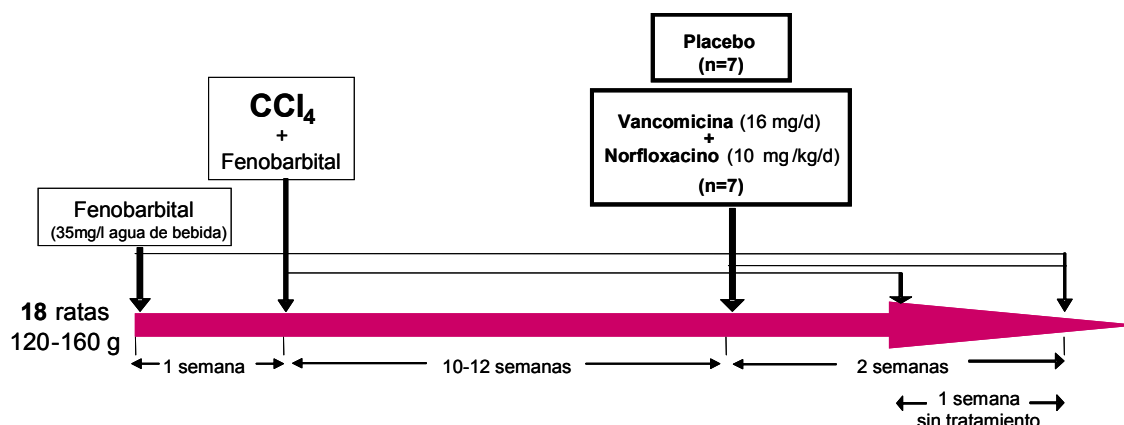


Figura 7. Diseño experimental del protocolo II.

Un efecto directo, por otra parte improbable, de los antibióticos orales no absorbibles en las variables inmunológicas testadas en el presente modelo experimental ya fue descartado previamente por nuestro grupo (Muñoz *et al.*, 2005).

Por último, con el fin de descartar un posible efecto directo del CCl₄ sobre la activación de las células del sistema inmune, administramos tres únicas dosis del hepatotóxico a un grupo de 5 ratas y analizamos el fenotipo y estado de activación de las células mononucleares de sangre periférica, GLM y GLH.

3. Extracción de muestras y obtención de suspensiones celulares

Tras ayuno nocturno, los animales fueron anestesiados con isoflurane (Forane; Abbott Laboratorios, Madrid, España). Una vez preparado el campo operatorio, en condiciones asépticas y con material quirúrgico estéril, se practicó una laparotomía sagital a nivel de la línea alba. Se extrajo el paquete intestinal y se realizó una punción de la aorta para la obtención de una muestra de 5 a 15 ml de sangre arterial. A continuación se disecaron y pesaron el GLM, que drena el lecho esplácnico del íleon terminal, ciego y colon ascendente (Carter *et al.*, 1974) y los GLH, situados bajo la arteria hepática y la vena porta (Tilney, 1971), (**Figura 8**).

Posteriormente se perfundió el hígado a través de la vena porta con una solución enzimática específica y se extrajo el órgano. Por último se obtuvo una muestra de heces del ileon terminal para el estudio microbiológico del SBI.

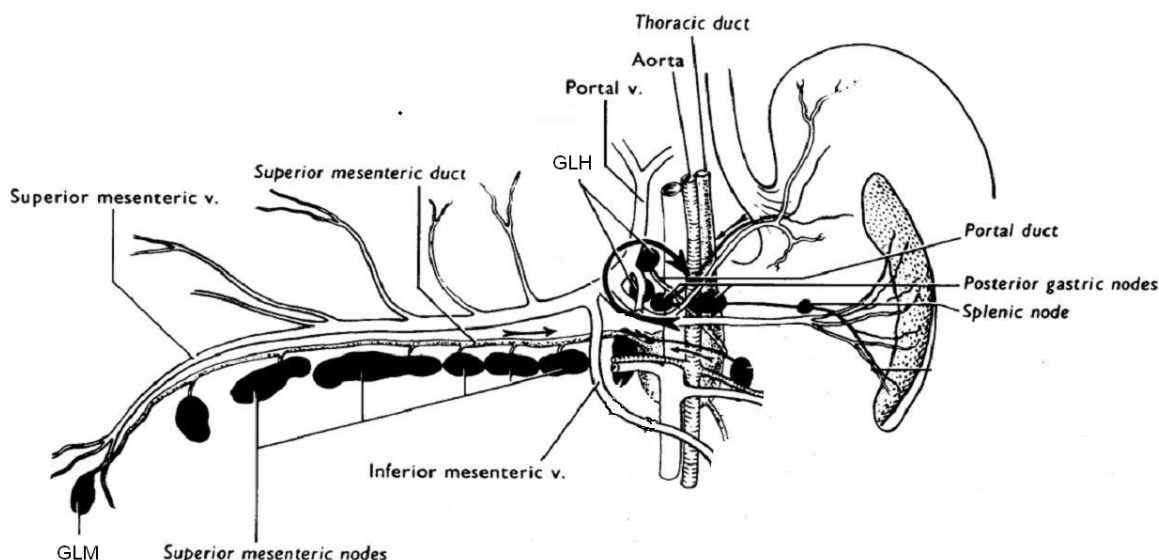


Figura 8. Detalle anatómico de la localización de los ganglios linfáticos objetos de este estudio. Imagen modificada extraída de **Tilney, 1971**.

Las células mononucleares de sangre periférica fueron obtenidas mediante centrifugación en un gradiente de densidad con Histopaque®-1083 (Sigma-Aldrich) (densidad = 1.083 ± 0.001 g/ml). Las células aisladas se resuspendieron a una concentración de 10^6 células/ml en medio de cultivo Dulbecco (Dulbecco's Modified Eagle Medium, DMEM; BioWhittaker, Verviers, Belgica) suplementado con $50 \mu\text{M}$ de β -mercaptoetanol (Sigma), 2% de penicilina-estreptomicina (BioWhittaker), 25mM de tampón HEPES (BioWhittaker) y 10% de suero bovino fetal (Fetal Calf Serum, FCS; Gibco, Grand Island, NY) al que previamente se le había inactivado la ruta del complemento mediante calor (60°C). Al DMEM suplementado se le denominará medio completo.

Para la obtención de la suspensión celular de los ganglios linfáticos, estos se disgregaron mediante presión en potter (Nessler, Madrid, España) al que se añadió un volumen de 2ml de medio completo y se filtró el homogenizado en un tamiz de acero inoxidable (Nessler) de $150 \mu\text{m}$ de tamaño de poro para retirar los restos de tejido, recuperando las células en una placa de Petri (Corning Incorporated, Nueva Cork, EEUU). Una muestra de este homogeneizado se empleó para realizar un estudio

microbiológico. Posteriormente las suspensiones celulares se lavaron con una solución salina (Hank's Balanced Salt Solution, HBSS; BioWhittaker), se centrifugaron a 1300rpm durante 10 minutos a 4°C, y posteriormente se retiró el sobrenadante y se resuspendieron las células a una concentración de 10^6 células/ml en medio completo. En las suspensiones celulares obtenidas de los ganglios de estudio se realizó un estudio inmunofenotípico.

Para la obtención de las células mononucleares residentes en el hígado se siguió el protocolo previamente descrito (Crispe, 1997) con algunas modificaciones. Tras la extracción de la muestra de sangre y para evitar el colapso de la vena porta, se procedió rápidamente a cortar la vena cava inferior justo por encima del hígado y se perfundió éste a través de la vena porta (**Figura 9**) con 50ml de medio de perfusión (HBSS atemperado a 37°C suplementado con 10% de FCS, 5mM de Magnesio (Mg^{2+}), 0.2mg/ml de colagenasa tipo IV (Sigma Aldrich), 0.02mg/ml de DNasa I (Roche, Mannheim, Germany) y 1mg/ml de colagenasa tipo I (Invitrogen, Grand Island, NY, USA)) de este modo se eliminó la sangre circulante al tiempo que se pretrató el tejido para la digestión de los depósitos de colágeno característicos de la cirrosis.

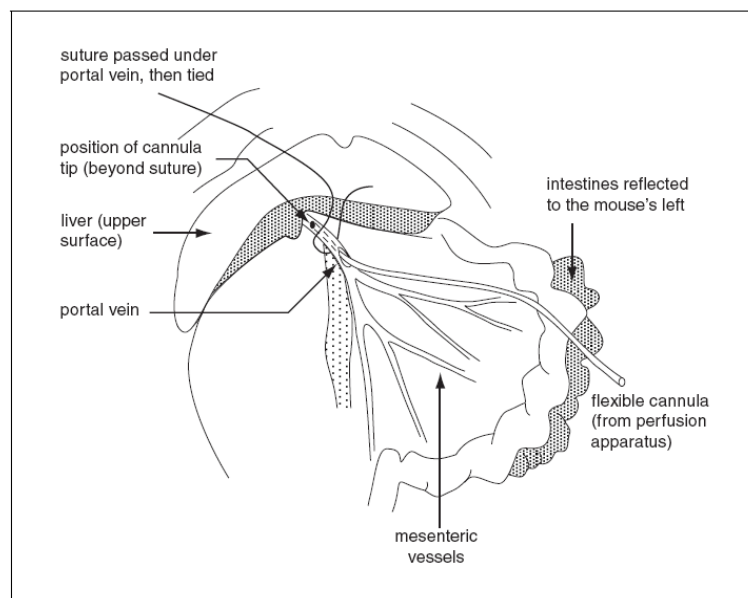


Figura 9. Detalle anatómico de la canulación en la vena porta. Imagen extraída de **Crispe, 1997**.

Una vez perfundido el hígado, se extrajo, pesó y conservó un pequeño fragmento en formol al 10% en tampón fosfato (PBS) para la posterior confirmación de la cirrosis hepática por histología. El resto del tejido se cortó en pequeños fragmentos de 5-10

mm y se sometió a una nueva digestión enzimática con 50ml de medio de digestión (Roswell Park Memorial Institute Medium, (RPMI-1640; BioWhittaker) suplementado con 5mM de Mg^{2+} , 0.2mg/ml de colagenasa tipo IV, 0.02mg/ml de DNasa I y 1mg/ml de colagenasa tipo I) durante 1 hora a 37°C y 400rpm. El homogenizado obtenido se terminó de disgregar mecánicamente en un potter y se filtró en una columna de tamices (Nessler) de tamaño de poro decreciente (de 250 μ m a 150 μ m) para eliminar los hepatocitos y agregados celulares. Las células del parénquima hepático se eliminaron mediante centrifugación a 1500rpm durante 10 min a temperatura ambiente, en gradiente de densidad en Percoll (GE Healthcare, Barcelona, España) al 33% en HBSS con 100 IU/ml de heparina. Por último se lisaron los eritrocitos mediante choque hipotónico durante 4min a 4°C con la solución salina específica de Gey y se eliminaron por centrifugación sobre 1ml de FCS a 1200rpm durante 7 min a 4°C. Se realizó un último lavado con HBSS a 1300rpm durante 10 min a 4°C y las células mononucleares intrahepáticas obtenidas se resuspendieron a una concentración de 10⁶ células/ml en medio completo.

Los valores absolutos de las células mononucleares obtenidas de GLM, GLH, hígado y la sangre periférica (células/ganglio $\times 10^{-3}$, células/hígado $\times 10^{-3}$ ó células/ μ l de sangre) se obtuvieron mediante recuento en microscopio. Para ello, en todas las suspensiones celulares se determinó la concentración celular y la viabilidad mediante la dilución con Azul Tripán al 0.1% (Sigma) y el recuento con microscopio en cámara de Neubauer (Brand, Wertheim, Alemania). El porcentaje de células viables se estableció por la capacidad de exclusión del colorante.

Las suspensiones celulares obtenidas de los cuatro compartimentos anatómicos de estudio se ajustaron a una concentración de 2 $\times 10^6$ células/ml en medio completo y se distribuyeron en alícuotas de 100 μ l/tubo (200000 células/tubo) en tubos de poliestireno de 5ml de fondo redondo (Becton Dickinson) para el estudio inmunofenotípico por citometría de flujo.

4. Parámetros bioquímicos de función hepática y renal

Una alícuota de la sangre obtenida por punción de la aorta se empleó para las determinaciones bioquímicas. Para ello se centrifugó la sangre a 2000rpm durante 20 minutos a temperatura ambiente y se recogieron los sueros del sobrenadante, se alícuotaron y se conservaron a -80°C hasta el momento del análisis.

Los niveles plasmáticos de urea, para valorar la función renal, la bilirrubina total, las transaminasas (alanina aminotransferasa -ALT- y aspartato aminotransferasa -AST-), la fosfatasa alcalina, la gamma glutamil transpeptidasa (GGT) y la albúmina, todos ellos parámetros de gran interés en la valoración clínica de la cirrosis, se midieron mediante un sistema automatizado estándar (Hitachi 747).

5. Anatomía patológica

Un fragmento de hígado de todas las ratas que forman parte del estudio fue conservado en formol para ser incluido en parafina y realizar una tinción según el método tricrómico de Goldner (Masson-Goldner) para identificar las fibras de colágeno (zonas fuertemente acidófilas).

6. Estudio inmunofenotípico

La distribución de células T, células B, monocitos y DCs se determinó en las suspensiones celulares de GLM, GLH, el hígado y la sangre periférica por citometría de flujo cuantitativa de 4 colores en un citómetro FACSCalibur utilizando el programa Cell Quest Pro 3.7 (Becton-Dickinson, San José, CA). Para el análisis de datos se utilizó el programa FlowJo 4.5 (Tree Star, San Carlos, CA) siguiendo un análisis jerárquico de grupos (**Figura 10**).

Para el estudio de la expresión de los antígenos de superficie, las suspensiones celulares se incubaron con combinaciones de anticuerpos monoclonales marcados con fluoresceína isotiocianato (FITC), ficoeritrina (PE), conjugado de la proteína clorofil peridina (PerCP), alofocianina (APC) o AlexaFluor647. Se utilizaron anticuerpos monoclonales de ratón específicos frente a los diferentes antígenos de rata objeto de estudio (**Tabla 1**).

Los anticuerpos monoclonales anti- CD3-APC (1F4), anti- CD4-FITC, PE y PerCP (OX 38), anti- CD8 α -PerCP (OX 8), anti- CD134-FITC (OX 40), anti- CD45RC-FITC (OX 22), anti- CD62L-FITC y PE (HRL1), anti- CD45RA-FITC (OX 33), anti- RT1B-PerCP (OX 6), anti- CD80-PE (3H5) y anti- NK-RP1A-PE (10/78) se obtuvieron de Pharmingen (BD Pharmingen, San Diego, CA, USA). Los anticuerpos monoclonales anti- CD11b-AlexaFluor647 (OX 42), anti- CD43-FITC (W3/13) y anti- OX62-PE (MRC OX-62) se obtuvieron de Serotec (Kidlington, Oxford, UK).

Tabla 1. Criterios de definición para las poblaciones del sistema inmune examinadas.

Subpoblación de células del sistema inmune	Función asociada con los receptores de superficie indicados
Células T	
CD3	Módulo de transducción de señal del receptor de células T para antígenos (complejo TCR/CD3). Expresado por todos los subgrupos de células T.
CD4	Co-receptor del complejo TCR/CD3 que reconoce antígenos presentados en moléculas de MHC de clase II. Identifica células Th. También lo expresan determinadas subpoblaciones de monocitos, macrófagos y DCs.
CD8	Co-receptor del complejo TCR/CD3 que reconoce antígenos presentados en moléculas de MHC de clase I. Identifica células Tc. También lo expresan la mayoría de células NK.
CD45RC	Isoforma del antígeno leucocitario común que identifica células T que no han tenido experiencia antigénica y que se internaliza tras la activación con su antígeno específico (Spickett <i>et al.</i> , 1983; Ramírez <i>et al.</i> , 2000; Subra <i>et al.</i> , 2001).
CD62L	Miembro de la familia de las selectinas definido como receptor de recirculación a órganos linfoides por los linfocitos T. Actúa regulando la unión del linfocito a las HEV en los ganglios linfáticos. Rápidamente eliminado tras la activación celular, sus niveles en la membrana celular permiten diferenciar los linfocitos vírgenes de los efectores/memoria (Sallusto <i>et al.</i> , 1999; Von Andrian <i>et al.</i> , 2000; Sallusto <i>et al.</i> , 2004).
CD134	Miembro de la familia del receptor de TNF α . Se expresa por células Th recientemente activadas <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i> . Participa en la coestimulación entre los linfocitos T y B (Paterson <i>et al.</i> , 1987; Weinberg <i>et al.</i> , 1994; Roos <i>et al.</i> , 1998; Broker <i>et al.</i> , 1999).
NK-RP1A débil	Receptor de reconocimiento de moléculas de MHC de clase I no clásicas expresado con intensidad intermedia por un subgrupo de linfocitos T denominados NK-T.
Células B	
CD45RA	Isoforma de alto peso molecular del CD45 presente en los linfocitos B de rata (Woollett <i>et al.</i> , 1985)
RT1B	Identifica el MHC de clase II (Chan <i>et al.</i> , 1987). Responsable de la presentación de antígenos a las células Th. Se expresa constitutivamente en la superficie de linfocitos B y se incrementa tras la activación.
CD80	Ig de membrana que se expresa en las APCs. Molécula coestimuladora que media en la adhesión y activación de las células T así como en la producción de citoquinas por parte de la propia APC.

Subpoblación de células del sistema inmune	Función asociada con los receptores de superficie indicados
Células NK	
NK-RP1A brillante	Receptor de reconocimiento de moléculas de MHC de clase I no clásicas expresado en alta intensidad por las células NK. Pertenece a la familia de las lectinas dependientes de calcio y actúa como una proteína transmembrana receptora en las células NK, con especificidad para carbohidratos y con propiedad de transmitir señales vía la proteinkinasa p56lck (Yokoyama <i>et al.</i> , 1993; Scriba <i>et al.</i> , 1998)
Monocitos	
CD11b brillante	Cadena α M de la integrina CR3 (también llamada Mac-1), presente en células de linaje mieloide, y cuya expresión aumenta en la superficie de estas células tras su activación (Tamatani <i>et al.</i> , 1991).
RT1B	MHC de clase II. Responsable de la presentación de antígenos a las células Th. Su expresión se induce en la superficie de los monocitos tras su activación.
NKR-P1A medio	Receptor de reconocimiento de moléculas de MHC de clase I no clásicas expresado con intensidad intermedia por los monocitos activados.
CD43 débil	También conocido como leucosialina y sialoforina, es una glicoproteína glicosilada que se expresa en la superficie de todos los leucocitos excepto las células B. Los monocitos se dividen en inflamatorios y residentes en base a su distinta capacidad migratoria y al nivel de expresión de este marcador. (Yrlid <i>et al.</i> , 2006).
Células Dendríticas	
OX-62	Integrina α E2 que identifica DCs de origen mieloide (Brenan <i>et al.</i> , 1997).
RT1B	MHC de clase II. Responsable de la presentación de antígenos a las células Th. Se expresa constitutivamente en la superficie de DCs y se incrementa tras la activación.

Una vez alicuotadas las suspensiones celulares de cada tejido objeto de estudio en los correspondientes tubos de citometría se añadieron 10 μ l/pocillo de un anticuerpo específico para el CD32 (CD32-Puro), que es el receptor y de la región Fc de tipo II de baja afinidad expresado en la superficie de los monocitos, los granulocitos, las células B y los eosinófilos (Simmons *et al.*, 1988). El objetivo de la incubación con este anticuerpo monoclonal fue bloquear estos receptores, evitando así la posible unión inespecífica de los anticuerpos monoclonales objeto de estudio que se incubaron posteriormente.

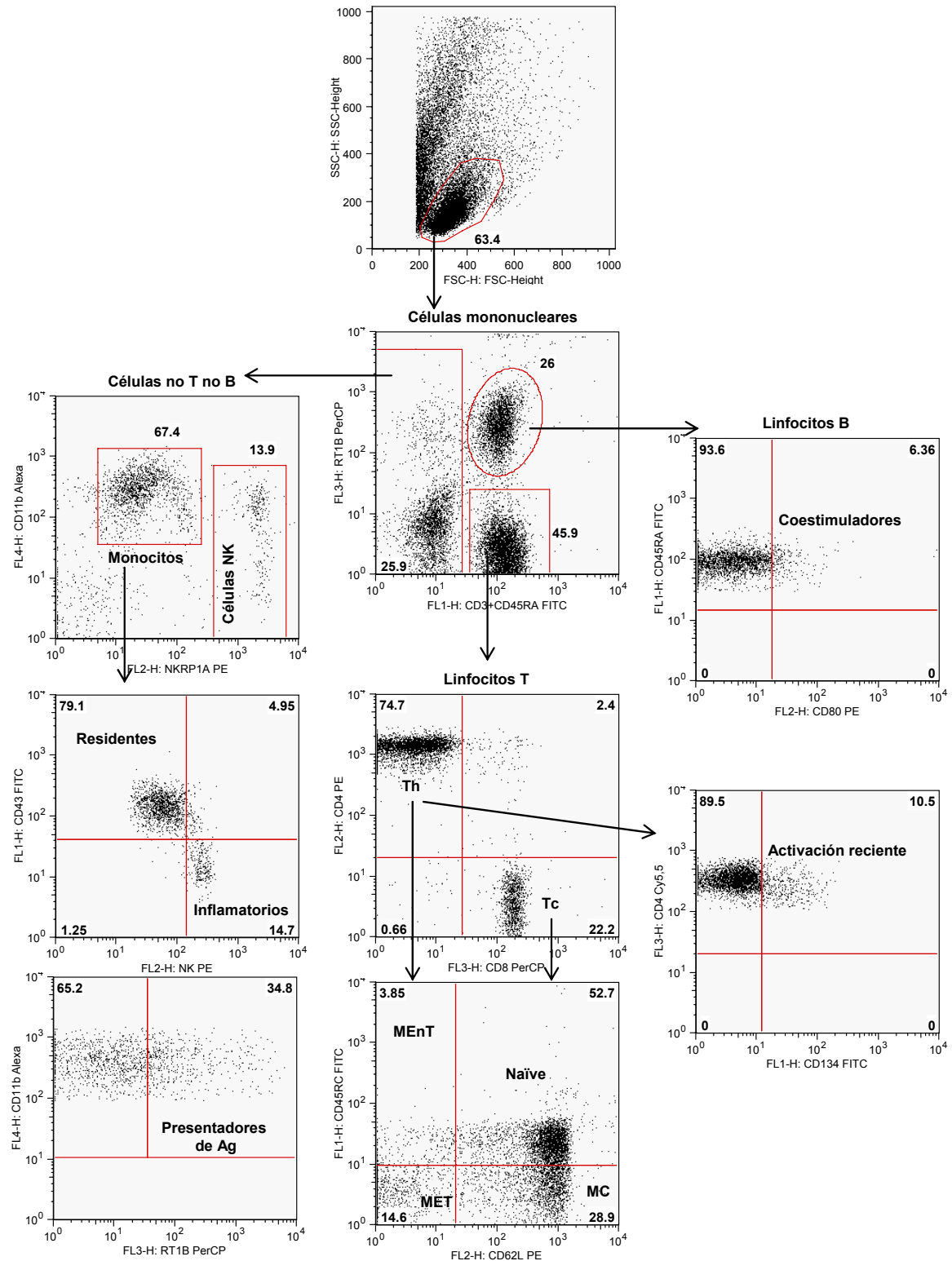


Figura 10. Análisis jerárquico de las diferentes subpoblaciones de células mononucleares mediante citometría de flujo. Los gráficos de puntos representan los porcentajes de células que expresan cada marcador. Los límites de los cuadrantes fueron establecidos utilizando los controles de isotipo de los anticuerpos monoclonales empleados.

Tras 10 minutos de incubación a 4°C en oscuridad, se añadieron 10µl de cada anticuerpo de acuerdo al panel inmunofenotípico indicado (**Tabla 2**), y se incubaron 20 minutos, a 4°C y en oscuridad.

Tabla 2. Panel inmunofenotípico de protocolos I y II

Tubo	FL1	FL2	FL3	FL4
1	control -	control -	control -	control -
2	IgG	IgG	IgG	IgG
3	CD3 + CD45RA	NK-RP1A	RT1B	CD11b
4	CD134	CD4	CD8	CD3
5	CD45RC	CD62L	CD8	CD3
6	CD45RC	CD62L	CD4	CD3
7	CD45RA	CD80	RT1B	CD11b
8	CD43	NK-RP1A	RT1B	CD11b
9	CD3 + CD45RA	OX62	RT1B	CD11b

Posteriormente, se lavaron las células con 2ml/tubo de HBSS al 10% de FCS y se centrifugaron a 1300rpm durante 5 minutos a 4°C. Después se retiró el sobrenadante y se resuspendieron las células de cada tubo en 200µl de PBS para su adquisición en el citómetro.

Para la determinación de la autofluorescencia o control negativo de las células, se incluyó un tubo de inmunofenotipo al que no se le añadió ningún anticuerpo monoclonal. El control de la unión inespecífica de los anticuerpos monoclonales se estableció incubando las células con una mezcla de inmunoglobulinas con fluorocromos que emiten luz en los 4 colores y del mismo isotipo que los anticuerpos utilizados en el resto del fenotipo, pero específicos de células de ratón (**Tabla 2**).

Los valores de números absolutos de las diferentes subpoblaciones celulares estudiadas se calcularon multiplicando el número total de células obtenidas en cada compartimento por el porcentaje de cada una de estas subpoblaciones determinado por citometría de flujo.

7. Determinación de marcadores inflamatorios

Se determinaron los niveles de citoquinas en suero y GLM. Para ello se empleó una alícuota del suero obtenido para las determinaciones bioquímicas y un GLM que se homogeneizó en PBS mediante sonicación usando un Procesador Ultrasónico UP100H (Hielscher, Teltow, Germany). Las muestras de suero y homogeneizado ganglionar se conservaron a -80°C hasta el momento del análisis.

Se utilizaron kits comerciales de ensayo inmunoabsorbente conjugado a enzimas (ELISA) (Biosource Internacional, Camarillo, CA and R&D systems) para determinar los niveles de TNF α e IL-6 de acuerdo con las instrucciones indicadas en los kits. Los umbrales de sensibilidad de los kits fueron de 5 y 8 pg/ml, respectivamente. Las densidades ópticas se determinaron en un lector de microplacas (Titertek Multiskan® PLUS) con un filtro de 450nm. Todas las determinaciones se realizaron por duplicado y se consideró el valor de la media.

8. Estudio microbiológico

Muestras de heces y homogenizados de ganglios (GLM y GLH) se inocularon en tubos de tioglicolato (BioMerieux, Madrid, España) y se incubaron a 37°C en condiciones aerobias y en un ambiente con un 5% de CO₂, durante 48 horas. Pasado este tiempo se evaluó la presencia de bacterias. En el caso de encontrar turbidez del tioglicolato, se subcultivaron en placas de agar sangre y agar McConkey (Materlab, Madrid, España) para la posterior identificación de los microorganismos específicos con un sistema automático (Microscan, Baxter, Irvine, CA).

La TBI se definió como la presencia de microorganismos viables en el cultivo en tioglicolato del GLM (Runyon *et al.*, 1991; Wiest *et al.*, 1999a; Perez-Páramo *et al.*, 2000). Para la determinación del SBI se calculó la cantidad total de bacterias intestinales aerobias como la suma de todas las bacterias aerobias presentes en la muestra de heces, y se expresó como unidades formadoras de colonias (logCFU) por gramo de heces.

9. Aislamiento, amplificación y secuenciación de ADN_{bact}

Para el aislamiento de ADN_{bact} se utilizó una muestra de 200µl del homogeneizado de GLM previamente recogido en tubo estéril y libre de pirógenos. Inicialmente, la muestra se incubó con 20µl de lisozima (20mg/ml) durante 30 minutos a 37°C en Thermomixer comfort (Eppendorf, Hamburg, Germany). A continuación, el ADN se extrajo mediante QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) siguiendo las instrucciones del fabricante. Todas las extracciones de ADN se llevaron a cabo en cabina de flujo laminar vertical (BV-100, Telstar, España) para evitar la contaminación de las muestras durante su manipulación.

El rendimiento y la pureza del ADN obtenido se evaluaron mediante un espectrofotómetro SmartSpec3000 (BioRad, Hercules, CA). Para ello se midió la absorbancia de la muestra a las longitudes de onda de 260 y 280 nm. Así mismo se calculó la relación 260/280 para detectar la presencia de posibles contaminantes proteicos.

Los extractos de ADN se amplificaron mediante la técnica de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) con una pareja de oligonucleótidos de amplio rango y altamente conservada del gen 16SrARN de los procariotas, generando un amplicón de 541pares de bases (pb), de acuerdo con la metodología previamente descrita (Such *et al.*, 2002). La secuencia de dichos oligonucleótidos es la siguiente:

Forward Primer (1F): 5'-AGAGTTTGATCATGGCTCAG-3'

Reverse Primer (1R): 5'-ACCGCGACTGCTGCTGGCAC-3'

La mezcla de la reacción pertenece a un kit comercial Taq PCR master Mix (QIAGEN, Germany) e incluyó: 20mM Tris-HCl (pH 8.0), 50mM KCl, 1,5mM MgCl₂, 200µM de cada nucleótido (dNTPs: dATP, dGTP, dCTP, dTTP), 0,3µM de primers, 0,5 unidades de Taq Polimerasa y 2µl de ADN molde. Los parámetros de amplificación utilizados fueron los siguientes: desnaturalización inicial a 95°C durante 5 minutos, seguida de 35 ciclos a 95°C 1 minuto, 55°C 30 segundos, 72°C 45 segundos y extensión final a 72°C durante 10 minutos. Las reacciones se llevaron a cabo en un termociclador MyCycler Thermal Cycler (Biorad, Hercules, CA).

Se incluyeron controles negativos y un control positivo con ADN procedente de un pool bacteriano compuesto por *E. coli*, *E. faecalis* y *S. aureus*. Todas las reacciones de

PCR se realizaron en una cabina de flujo laminar (Mini-V/PCR, Telstar, España) y en una habitación físicamente separada de la utilizada para la extracción de ADN de las muestras.

La detección de ADN se realizó mediante electroforesis en geles de agarosa (Biorad) a una concentración de 2% (p/v) en TBE 0.5X (Biorad) con bromuro de etidio (10mg/ml) (Sigma-Aldrich) sumergidos en una cubeta con el mismo tampón sin bromuro de etidio. A las muestras se le añadió tampón de carga (azul de bromofenol 0.1% (p/v), glicerol 50% (v/v), EDTA (ácido etilendiaminotetracético) 0.1M, pH 8.0) (Promega, USA) y en uno de los extremos del gel se cargó un volumen de 1.5µl de marcador de pesos GelPilot Low Range Ladder (Qiagen). El campo eléctrico aplicado se ajustó en función de las características de los fragmentos analizados, variando entre 110V y 120V. Los fragmentos de ADN se visualizaron en un sistema de fotodocumentación de geles Gel Doc XR (BioRad).

La secuenciación de ADN se llevó a cabo utilizando un secuenciador automático modelo ABI Prism 377 (Applied Biosystems, Foster City, CA), como se ha descrito previamente (Such *et al.*, 2002). El producto de PCR se purificó mediante QIAquick Spin Columns (QIAquick PCR Purification Kit, Qiagen) para eliminar el resto de sales, primers y dNTPs. El producto purificado se utilizó como molde para la reacción de secuenciación con Dye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Ready Reaction kit (Applied Biosystems), usando como primer de secuenciación el siguiente oligonucleótido: 5'-TTACGCGGCTGCTGGCACG-3'; y con los siguientes ciclos de PCR: 96°C 1 minuto, 25 ciclos de 96°C 10 segundos, 50°C 5 segundos y 60°C 4 minutos, seguido de un mantenimiento a 4°C. Las secuencias obtenidas se compararon con las secuencias de 16SrARN disponibles en las bases de datos internacionales (Ribosomal Database Project, GeneBank) usando el software de alineamiento y búsqueda avanzada BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

10. Análisis estadístico

El análisis estadístico de las variables obtenidas se llevó a cabo con herramientas informáticas, utilizando el programa SPSS (Statistical Package for Social Sciences) versión 15.0 (Chicago, IL). Todas las variables inmunofenotípicas analizadas siguen una distribución normal, por lo que los resultados se expresan como media \pm desviación estándar (sd). Las variables cuantitativas se analizaron mediante una t de

Student no pareada, y los coeficientes de correlación lineal se estimaron por el coeficiente de correlación de Pearson.

El nivel de significación estadística se fijó en $p < 0.05$. La representación gráfica de los datos se realizó con el programa Sigma Plot 10.0 (SPSS Inc, Chicago, IL) para Windows.

11. Búsqueda bibliográfica

La principal fuente de información ha sido la base de datos Medline, en la página web <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Pubmed>. Se trata de la base más completa, fiable y rigurosa de que se dispone en biomedicina, de gran cobertura y bien estructurada.

La búsqueda se realizó mediante la introducción de palabras clave en inglés, seleccionando los artículos de las revistas de mayor impacto dentro del área que nos ocupa, y mediante la utilización de algunas de las herramientas disponibles en esta base de datos, como la búsqueda de artículos relacionados con un artículo determinado o la limitación en el tiempo de publicaciones dirigidas a un tema en concreto. En algunos casos se realizó introduciendo el nombre de autores de artículos de gran impacto relacionados con el tema en estudio, revisando sus publicaciones hasta la actualidad.

RESULTADOS

1. Inducción de cirrosis, mortalidad y parámetros bioquímicos de función hepática y renal

Diecisiete de los cuarenta y cinco animales (38%) que iniciaron el tratamiento con CCl_4 en el desarrollo del protocolo I murieron durante el proceso de inducción de cirrosis. De los veintiocho animales que concluyeron el tratamiento, ninguno presentaba líquido ascítico en la cavidad peritoneal el día del experimento y todos desarrollaron cirrosis hepática confirmada por histología. El informe de Anatomía Patológica, llevado a cabo por el Dr. Moreno, concluyó que de las veintiocho muestras de hígado analizadas, un 25% presentaba cirrosis mixta, otro 25% cirrosis micronodular y el 50% restante presentaba necrosis hepática confluyente porto-venular con presencia de nódulos hiperplásicos.

En las ratas cirróticas se encontraron algunas de las alteraciones clínicas y bioquímicas propias de la enfermedad, como la insuficiencia hepática y la ictericia, no así la insuficiencia renal. Así pues, las concentraciones séricas de bilirrubina, transaminasas y demás enzimas hepáticas analizadas fueron significativamente mayores y las de albúmina significativamente menores en las ratas con cirrosis compensada que en los controles. Por el contrario, la concentración sérica de urea entre ambos grupos de ratas no presentó cambios significativos (**Tabla 3**).

Tabla 3. Parámetros bioquímicos de función hepática y renal en ratas cirróticas compensadas y ratas control.

	Parámetros bioquímicos	
	Cirrosis compensada (n=28)	Controles (n=20)
Albúmina (g/dl)	3,11 ± 0,69 ‡	3,69 ± 0,35
Fosfatasa Alcalina (U/l)	152,79 ± 63,95 ‡	74,13 ± 33,98
ALT (U/l)	52,00 ± 6,90 *	21,13 ± 2,44
AST (U/l)	122,36 ± 14,80 *	64,13 ± 8,01
Bilirrubina total (mg/dl)	0,51 ± 0,43 *	<0,10
Creatinina (mg/dl)	0,43 ± 0,08 †	0,55 ± 0,11
GGT (U/l)	5,93 ± 4,05 *	1,00 ± 0,00
Urea (mg/dl)	29,79 ± 7,59	30,50 ± 3,82

Los datos se presentan como media ± SD. * p<0,001 vs controles; † p<0,01 vs controles; ‡ p<0,05 vs controles;

2. Estudio inmunofenotípico de sangre periférica

A diferencia de lo previamente descrito por nuestro grupo tanto en pacientes (Albillos *et al.*, 2004b) como en el modelo experimental (Muñoz *et al.*, 2005) de cirrosis con ascitis, las ratas con cirrosis compensada no mostraron una depleción significativa en el número absoluto de células mononucleares circulantes. Estas células mostraron una tendencia, aunque no estadísticamente significativa, a aumentar con respecto a las ratas control (2840 ± 1531 vs. 2039 ± 906 células/ μ l; ns).

Aquellas poblaciones de células con capacidad presentadora de antígeno, como linfocitos B, monocitos y DCs sí se encontraron significativamente expandidas en las ratas enfermas con respecto a los controles sanos. El mayor aumento correspondió a la población de monocitos, que aumentó 4 veces ($p < 0.001$) y el de DCs que lo hizo más de 2 veces ($p < 0.05$) (Tabla 4).

Tabla 4. Número absoluto de células mononucleares circulantes en la sangre periférica de ratas cirróticas compensadas y ratas control.

	Sangre periférica (células/ μ l)	
	Cirrosis compensada (n=28)	Controles (n=20)
<i>Subpoblaciones celulares del sistema inmune</i>		
Células T (CD3+)	1243 ± 554	1087 ± 522
Células Th (CD4+CD8-)	896 ± 397	761 ± 359
Células Th recientemente activadas (CD134+)	89 ± 49 *	17 ± 11
Células Th memoria efectora (ThME, CD62L-)	106 ± 60 ‡	66 ± 41
Células Tc (CD4-CD8+)	307 ± 170	293 ± 164
Células Tc memoria efectora (TcME, CD62L-)	38 ± 25	32 ± 20
Células NK-T (CD3+NK-RP1A ^{medio+})	189 ± 154 ‡	139 ± 67
Células B (CD45RA+)	871 ± 385 †	580 ± 345
Células B activadas (CD80+)	24 ± 19 ‡	10 ± 7
Monocitos (CD3-CD45RA-NK-RP1A ^{brillante} -CD11b ^{brillante+})	491 ± 202 *	126 ± 70
Monocitos inflamatorios (CD43-NK-RP1A ^{medio+})	88 ± 55 *	30 ± 17
DCs (CD3-CD45RA-OX62+RT1B ^{brillante+})	11 ± 9 ‡	5 ± 6

Los datos se presentan como media \pm SD. * $p < 0,001$ vs controles; † $p < 0,01$ vs controles; ‡ $p < 0,05$ vs controles;

Del mismo modo, el número de células B, se expandió 1.5 veces ($p<0.01$) con respecto a los controles (**Tabla 4**). El incremento de la población de linfocitos B contrasta con lo descrito en cirrosis con ascitis experimental, donde esta población sufre una marcada retracción (Muñoz *et al.*, 2005).

Una característica de la cirrosis con ascitis que sí se mantiene en la cirrosis compensada es el incremento en el número absoluto de células mononucleares circulantes que expresan marcadores relacionados con el estado de activación. En concreto, las ratas cirróticas compensadas mostraron un aumento de más de 5 veces ($p<0.001$) de la subpoblación de células Th que expresan en su superficie la molécula CD134, receptor de superficie celular miembro de la familia del receptor de TNF α implicado en la coestimulación y que denota activación reciente de las células T (Roos *et al.*, 1998, Weinberg *et al.*, 1994; Broker *et al.*, 1999) (**Figura 11**) (**Tabla 4**).

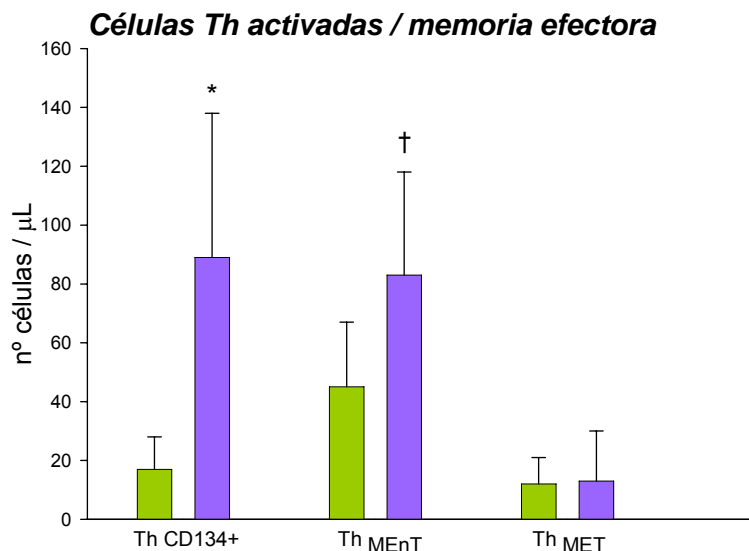


Figura 11. Número absoluto de células Th recientemente activadas, Th_{MET} y Th_{ME nT} en sangre periférica de ratas cirróticas compensadas (■) y controles sanos (■). Los datos se presentan como media \pm SD. * $p<0,001$ vs controles; † $p<0,01$ vs controles.

El aumento de la población de células Th recientemente activadas coincidió con el incremento de los linfocitos Th que, al activarse, internalizaron la molécula CD62L, pasando así a ser células Th memoria efectoras (Th_{ME}), Th CD62L- (106 ± 60 vs. 66 ± 41 células/ μ L; $p<0.05$), sin encontrarse modificadas significativamente las poblaciones Th naive (386 ± 201 vs. 371 ± 223 células/ μ L; n.s) ni memoria central (Th_{MC}) (189 ± 92 vs. 247 ± 95 células/ μ L; n.s). Ello es indicativo de una activación local de estos linfocitos, ya que la ausencia de expresión de esta molécula en la superficie celular va a impedirles volver a entrar en un órgano linfoide secundario (Sallusto *et al.*, 1999; Von

Andrian *et al.*, 2000). Por lo tanto, una vez que estas células se activan y salen del ganglio linfático al torrente sanguíneo, se dirigen, guiadas por quimioquinas y moléculas de adhesión recién expresadas, al tejido inflamado de donde procedía el antígeno que las activó (Young *et al.*, 1999; Jenkins *et al.*, 2001). Dentro de la población Th_{ME} se pueden diferenciar a su vez dos subpoblaciones. Así, podemos distinguir entre células terminadas (Th_{MET}; CD3+CD62L-CD45RC+; aquellas con mayor capacidad citotóxica) y no terminadas (Th_{MEN}; CD3+CD62L-CD45RC-; aquellas con mayor capacidad para producir citoquinas), en función de la co-expresión o no del marcador CD45RC (Hamann *et al.*, 1997; Sallusto *et al.*, 1999; Ramírez *et al.*, 2000; Rufer *et al.*, 2003; Seder *et al.*, 2003; Sallusto *et al.*, 2004; Lanzavecchia *et al.*, 2005). Como se observa en la **figura 11**, en las ratas con cirrosis compensada, las células Th_{ME} circulantes, con mayor capacidad de producción de citoquinas (T CD4+CD62L-CD45RC-), se duplicaron respecto a las ratas control ($p < 0.01$).

Del mismo modo, observamos un incremento significativo en la población de monocitos inflamatorios circulantes en la sangre periférica de las ratas cirróticas, caracterizados por la internalización del receptor CD43 y la expresión del NKR-P1A (CD43-NK-RP1A^{medio}+), lo que según diversos autores les confiere mayor capacidad fagocítica y la habilidad de migrar e infiltrar tejidos inflamados (Yrlid *et al.*, 2006; Steiniger *et al.*, 2001)

3. Estudio de marcadores inflamatorios séricos

En concordancia con el incremento significativo de células Th y monocitos activados en la sangre periférica de las ratas cirróticas compensadas, pudimos comprobar un incremento en los niveles séricos de las citoquinas proinflamatorias analizadas, IL-6 y TNF α (**Tabla 5**).

Tabla 5. Concentración de citoquinas séricas en ratas cirróticas compensadas y controles sanos.

	Citoquinas séricas (pg/ml)	
	Cirrosis compensada (n=28)	Controles (n=20)
IL- 6	58,2 \pm 1,2 *	50,6 \pm 2,8
TNF α	9,4 \pm 0,6 *	8,9 \pm 0,2

Los datos se presentan como media \pm SD. * $p < 0,05$ vs controles;

Esto demuestra que el estado proinflamatorio sistémico característico de la cirrosis es un evento temprano en el desarrollo de la enfermedad y que no está ligado a la aparición de manifestaciones clínicas como la ascitis.

4. Signos de activación de las células mononucleares de hígado

De acuerdo con nuestra hipótesis, el hígado, órgano diana de inflamación en cirrosis, sería la fuente de activación de las células inmunitarias activadas presentes en la sangre periférica de las ratas con cirrosis compensada. El estudio inmunofenotípico del hígado reveló que, a diferencia de lo descrito en la sangre periférica de las ratas con cirrosis compensada, las APCs (células B, monocitos y DCs) no presentaban diferencias significativas en el número absoluto de células, ni en la población total ni en las subpoblaciones activadas, aunque si tendían a disminuir (**Tabla 6**).

Tabla 6. Número absoluto de células mononucleares residentes en el hígado de ratas cirróticas compensadas y ratas control.

	Hígado (células/hígado x 10 ⁻³)	
	Cirrosis compensada (n=28)	Controles (n=20)
<i>Subpoblaciones celulares del sistema inmune</i>		
Células T (CD3+)	6350 ± 2691	5551 ± 1997
Células Th (CD4+CD8-)	4677 ± 2481	3281 ± 1107
Células Th recientemente activadas (CD134+)	785 ± 411 *	163 ± 101
Células Th memoria efectora (ThME, CD62L-)	4910 ± 3340 ‡	1450 ± 401
Células Tc (CD4-CD8+)	1316 ± 563	1831 ± 909
Células Tc memoria efectora (TcME, CD62L-)	1010 ± 348	629 ± 258
Células NK-T (CD3+NK-RP1A^{medio+})	817 ± 586	1233 ± 789
Células NK (CD3-NK-RP1A^{brillante+})	2899 ± 1905 †	5162 ± 2658
Células B (CD45RA+)	3655 ± 2037	5937 ± 3582
Células B activadas (CD80+)	417 ± 292	373 ± 281
Monocitos (CD3-CD45RA-NK-RP1A^{brillante}-CD11b^{brillante+})	5305 ± 4128	5062 ± 2714
Monocitos inflamatorios (CD43-NK-RP1A ^{medio+})	1713 ± 394	1874 ± 726
DCs (CD3-CD45RA-OX62+RT1B^{brillante+})	256 ± 143	405 ± 224

Los datos se presentan como media ± SD. * p<0,001 vs controles; † p<0,01 vs controles; ‡ p<0,05 vs controles;

No obstante, sí encontramos un claro incremento en el número absoluto de linfocitos T que expresaban marcadores relacionados con el estado de activación. Así, observamos un incremento de casi 5 veces en el número de células Th que expresan el marcador CD134 ($p < 0.001$) (**Figura 12**) y de 3.4 veces en el de aquellas que al activarse internalizaron el CD62L ($p < 0.05$) (**Tabla 6**). Por el contrario, las poblaciones celulares Th naive y Th_{MC} se encontraron disminuídas significativamente con respecto a los controles sanos (196 ± 93 vs. 791 ± 357 células/hígado $\times 10^{-3}$; $p < 0.01$ y 105 ± 90 vs. 708 ± 326 células/hígado $\times 10^{-3}$; $p < 0.01$, respectivamente). Al analizar las diferentes subpoblaciones de células Th_{ME} residentes en el hígado, sí encontramos un incremento significativo de la subpoblación de células Th_{ME nT} (T CD4+CD62L-CD45RC-) en el hígado de las ratas con cirrosis compensada al compararlo con los controles sanos (**Figura 12**).

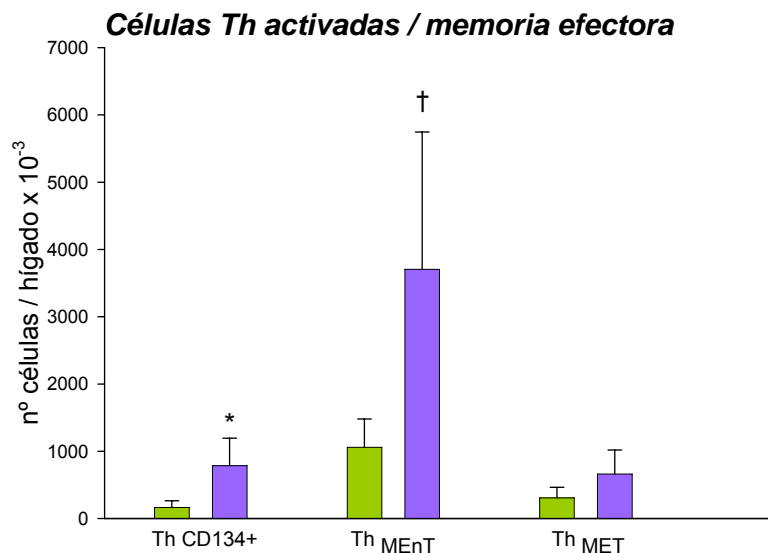


Figura 12. Número absoluto de células Th recientemente activadas, Th_{MET} y Th_{ME nT} en el hígado de ratas cirróticas compensadas (■) y controles sanos (■). Los datos se presentan como media \pm SD. * $p < 0,001$ vs controles; † $p < 0,01$ vs controles.

Al igual que ha sido descrito en otros modelos experimentales de cirrosis hepática (Shirachi *et al*, 1998), el número de células NK presentes en el hígado de las ratas con cirrosis compensada se encontraba significativamente reducido con respecto a los hígados de ratas sanas (2.899 ± 1.905 vs. 5.162 ± 2.658 células/hígado $\times 10^{-3}$; $p < 0.01$).

Estos cambios en el número absoluto de las poblaciones celulares anteriormente mencionadas se tradujeron en una modificación en la distribución de poblaciones de células inmunitarias residentes en el hígado de las ratas cirróticas. Así, mientras que en las ratas sanas, las poblaciones mayoritarias analizadas se distribuían de manera equitativa ($17,81 \pm 3,88$ % para linfocitos T; $16,81 \pm 4,62$ % para linfocitos B; $17,14 \pm 5,73$ % para linfocitos NK y $16,99 \pm 4,35$ % para monocitos), con el desarrollo de la enfermedad se produce una disminución relativa del porcentaje de linfocitos NK ($11,07 \pm 3,60$ % vs. $17,14 \pm 5,73$ %; $p < 0.01$), con un marcado aumento en el porcentaje de los linfocitos T ($23,79 \pm 5,14$ % vs. $17,81 \pm 3,88$ %; $p < 0.001$) mientras que los porcentajes de linfocitos B ($15,39 \pm 6,50$ % vs. $16,81 \pm 4,62$ %; n.s) y monocitos ($18,51 \pm 11,56$ % vs. $16,99 \pm 4,35$ %; n.s) no sufrieron modificaciones estadísticamente significativas.

De acuerdo con el modelo ampliamente aceptado de respuesta inmune adquirida, las APCs, al capturar los antígenos, van a modificar el patrón de expresión de algunas de sus moléculas de superficie para adquirir una mayor capacidad presentadora (p. ej. MHC-II) y migrar a los ganglios linfáticos de drenaje del tejido, donde presentarán los antígenos ya procesados a las células T, que recirculan continuamente a través de los órganos linfoides secundarios (MacKay *et al.*, 1992).

En caso de que el linfocito T encuentre su antígeno específico en la MHC-II de las APCs, va a activarse y a sufrir una expansión clonal, modificando también el patrón de expresión de algunas de sus moléculas de superficie (p. ej. selectinas), y va a abandonar esta localización para dirigirse a los tejidos inflamados, donde se encargan de aclarar a los agentes patógenos que provocaron su activación, causando lesiones locales a este nivel (MacKay *et al.*, 1992; Young, 1999).

Por ello, debemos considerar que la respuesta del sistema inmune a los antígenos hepáticos tendrá lugar en sus ganglios linfáticos de drenaje, los GLH, localizados bajo la arteria hepática y la vena porta (Tilney, 1971; Oo *et al.*, 2010).

De este modo, las APCs del hígado captan los antígenos hepáticos y migran a los ganglios donde son presentados a los linfocitos T, lo que produce su activación, expansión clonal y direccionamiento a hígado. Este modelo de respuesta inmune explicaría la tendencia a la reducción de las APCs en el hígado (aunque no llega a ser

significativa estadísticamente) asociada al incremento de las subpoblaciones activadas de células Th.

5. Signos de activación de las células mononucleares del GLH

Para comprobar si también se cumple el modelo de respuesta inmune adquirida en el GLH, caracterizamos el perfil inmunofenotípico de las células T, B y monocitos en estos órganos linfoides secundarios.

Las poblaciones de células T y B de los GLH de las ratas cirróticas se encontraron significativamente expandidas, alcanzando valores superiores a 1.7 y 2.1 veces ($p < 0.01$), respectivamente, a los detectados en controles pareados (**Tabla 7**).

Tabla 7. Número absoluto de células mononucleares en los GLH de ratas cirróticas compensadas y controles sanos.

	GLH (células/gangliox 10^{-3})	
	Cirrosis compensada (n=28)	Controles (n=20)
<i>Subpoblaciones celulares del sistema inmune</i>		
Células T (CD3+)	2583 \pm 1340 *	1495 \pm 799
Células Th (CD4+CD8-)	2098 \pm 1088 †	1077 \pm 666
Células Th recientemente activadas (CD134+)	319 \pm 114 *	68 \pm 37
Células Th memoria efectora (ThME, CD62L-)	987 \pm 473 *	228 \pm 102
Células Tc (CD4-CD8+)	407 \pm 249	390 \pm 127
Células Tc memoria efectora (TcME, CD62L-)	53 \pm 35	34 \pm 22
Células NK-T (CD3+NK-RP1A ^{medio+})	68 \pm 39	21 \pm 16
Células B (CD45RA+)	1449 \pm 672 †	699 \pm 308
Células B activadas (CD80+)	73 \pm 53 †	19 \pm 18
Monocitos (CD3-CD45RA-NK-RP1A ^{brillante-} CD11b ^{brillante+})	38 \pm 28 †	6 \pm 4
Monocitos inflamatorios (CD43-NK-RP1A ^{medio+})	18 \pm 14 †	3 \pm 2
Monocitos presentadores de antígeno (RT1B+)	35 \pm 26 †	5 \pm 2
DCs (CD3-CD45RA-OX62+RT1B ^{brillante+})	63 \pm 43 †	12 \pm 11

Los datos se presentan como media \pm SD. * $p < 0,001$ vs controles; † $p < 0,01$ vs controles; ‡ $p < 0,05$ vs controles.

Es de destacar que el aumento más significativo se produjo en la población de APCs, que, siendo minoritarias en el GLH de las ratas control, llegaron a aumentar más de 6

veces en el caso de los monocitos ($p < 0.01$) y de 5 veces ($p < 0.01$) en el caso de las DCs en las ratas cirróticas. (Tabla 7).

La expansión de estas poblaciones de células del sistema inmune se tradujo en una adenopatía en las ratas cirróticas que determinamos por el aumento de peso de los GLH, que pasó de 13 ± 6 mg en las ratas control a 27 ± 12 mg en las ratas cirróticas sin ascitis ($p < 0.05$).

El estudio de la expresión de los antígenos de superficie nos permitió determinar que la expansión del compartimento de células T observada en las ratas cirróticas, ocurrió principalmente a expensas de las células T CD4+ (2098 ± 1088 vs. 1077 ± 666 células/ganglio $\times 10^{-3}$; $p < 0.01$). A su vez, la subpoblación de células Th que más aumentó fue aquella que había tenido experiencia previa con el antígeno, como lo demuestra el aumento, de casi 5 veces, de las células Th CD134+ y de más de 4 veces de los linfocitos Th CD62L- (Tabla 7), (Figura 13).

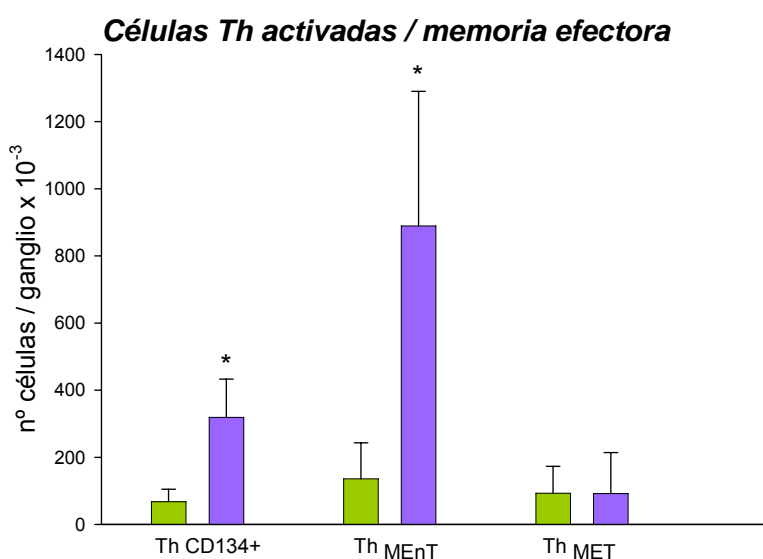


Figura 13. Número absoluto de células Th recientemente activadas, Th_{MET} y Th_{ME nT} en el GLH de ratas cirróticas compensadas (■) y controles sanos (■). Los datos se presentan como media \pm SD. * $p < 0,001$ vs controles.

Al analizar las subpoblaciones efectoras de los linfocitos Th encontramos un incremento de casi 9 veces de la subpoblación de células Th_{ME nT} (CD4+CD62L-CD45RC-), aquellas con mayor capacidad de producción de citoquinas (Figura 13). Por el contrario, las poblaciones celulares Th naive y Th_{MC} no presentaron cambios

significativos (89 ± 121 vs. 103 ± 66 células/ganglio $\times 10^{-3}$; n.s y 398 ± 181 vs. 371 ± 254 células/ganglio $\times 10^{-3}$; $p < 0.01$, respectivamente).

Al igual que observamos para la población de células T, las subpoblaciones activadas de las células B y monocitos fueron significativamente superiores en el GLH de las ratas cirróticas en comparación con las ratas control (**Tabla 7**). Por tanto, el modelo de respuesta inmune también explica el incremento de APCs en los GLH, donde presentan los antígenos capturados en el hígado a los linfocitos T, lo que produciría su activación y expansión clonal, causando el incremento de las subpoblaciones activadas de células Th.

6. Signos de activación de las células mononucleares del GLM

Al igual que los GLH, el GLM presentó una expansión significativa de las poblaciones de células T, B, monocitos y DCs en las ratas cirróticas sin ascitis, que de nuevo se tradujo en una adenopatía, como determinamos por el incremento estadísticamente significativo del peso del ganglio (24.67 ± 12.98 vs. 15.47 ± 7.73 mg, $p < 0.05$).

Así, las células T aumentaron 1.4 veces ($p < 0.05$) y las células B 1.7 veces ($p < 0.001$), mientras que los monocitos y las DCs lo hicieron 3 y 2.3 veces, respectivamente ($p < 0.05$), (**Tabla 8**).

La expansión del compartimento de células T observada en las ratas cirróticas, ocurrió nuevamente a expensas de la subpoblación de células T CD4⁺ activadas, como lo demuestra el aumento de 1.7 veces ($p < 0.01$) tanto de las células Th CD134⁺ como de las células Th CD62L⁻ (**Tabla 8**).

Como observamos al analizar las subpoblaciones de memoria efectora de los linfocitos Th en los GLH, encontramos un incremento significativo de la subpoblación de células Th_{MEN}T (CD3⁺CD4⁺CD62L⁻CD45RC⁻) en los GLM de las ratas cirróticas compensadas (**Figura 14**), aunque en este caso el incremento no llega a duplicar el valor de los controles como ocurre en el GLH.

Al igual que para el GLH, las poblaciones celulares Th naive y Th_{MC} no presentaron cambios significativos (2.460 ± 1.601 vs. 1.935 ± 998 células/ganglio $\times 10^{-3}$; n.s y 923 ± 642 vs. 902 ± 597 células/ganglio $\times 10^{-3}$; $p < 0.01$, respectivamente).

Del mismo modo, las subpoblaciones activadas de las células B y de los monocitos fueron significativamente superiores ($p<0.01$) en el GLM de las ratas cirróticas sin ascitis comparadas con los controles (Tabla 8).

Tabla 8. Número absoluto de células mononucleares presentes en los GLM de ratas cirróticas compensadas y ratas control.

	GLM (células/ganglions 10^{-3})	
	Cirrosis compensada (n=28)	Controles (n=20)
<i>Subpoblaciones celulares del sistema inmune</i>		
Células T (CD3+)	7222 \pm 3199 \ddagger	5208 \pm 2890
Células Th (CD4+CD8-)	4724 \pm 2875	3768 \pm 1968
Células Th recientemente activadas (CD134+)	458 \pm 252 \dagger	254 \pm 160
Células Th memoria efectora (ThME, CD62L-)	1387 \pm 663 *	809 \pm 253
Células Tc (CD4-CD8+)	1344 \pm 805	1328 \pm 801
Células Tc memoria efectora (TcME, CD62L-)	190 \pm 73	143 \pm 68
Células NK-T (CD3+NK-RP1A ^{medio+})	123 \pm 129	77 \pm 65
Células B (CD45RA+)	5589 \pm 2362 *	3214 \pm 1657
Células B activadas (CD80+)	132 \pm 70 \dagger	50 \pm 60
Monocitos (CD3-CD45RA-NK-RP1A ^{brillante} -CD11b ^{brillante+})	54 \pm 42 \ddagger	17 \pm 11
Monocitos inflamatorios (CD43-NK-RP1A ^{medio+})	38 \pm 15 \dagger	8 \pm 5
Monocitos presentadores de antígeno (RT1B+)	40 \pm 23 *	13 \pm 9
DCs (CD3-CD45RA-OX62+RT1B ^{brillante+})	88 \pm 69 *	38 \pm 27

Los datos se presentan como media \pm SD. * $p<0,001$ vs controles; \dagger $p<0,01$ vs controles; \ddagger $p<0,05$ vs controles.

7. Estudio microbiológico del GLM

Trabajos previos han demostrado que en la cirrosis con ascitis, bacterias o productos bacterianos de origen entérico abandonan la luz intestinal y son capturados por las APCs, que los dirigen al GLM de drenaje (Carter *et al.*, 1974; Wiest *et al.*, 1999a). A este nivel, las bacterias o sus productos bacterianos son presentados a los linfocitos T por las APCs, lo que provoca su activación y expansión clonal (MacKay *et al.*, 1992). Esta activación inmunológica, aunque se inicia selectivamente en los GLM, posteriormente tiene gran repercusión a nivel sistémico por la recirculación de estas células (Muñoz *et al.*, 2005).

No obstante, la TBI, definida como el crecimiento de bacterias en el cultivo de GLM, se ha descrito en ratas cirróticas con ascitis (Garcia-Tsao *et al.*, 1995; Pérez-Páramo *et al.*, 2000) pero está ausente en aquellas sin ascitis (Garcia-Tsao *et al.*, 1995). Por esta razón, investigamos la contribución de las bacterias entéricas a la activación de las células del sistema inmune de los GLM de nuestras ratas cirróticas sin ascitis. De acuerdo con lo previamente descrito (Garcia-Tsao *et al.*, 1995), no observamos crecimiento de bacterias aerobias en el cultivo en tioglicolato de los GLM, ni en las ratas cirróticas sin ascitis, ni en las ratas sanas.

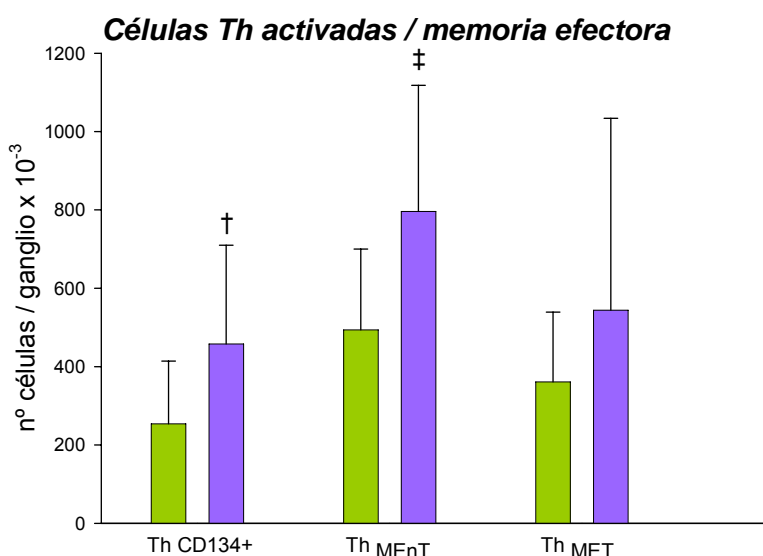


Figura 14. Número absoluto de células Th recientemente activadas, Th_{MET} y Th_{ME nT} en el GLM de ratas cirróticas compensadas (■) y controles sanos (■). Los datos se presentan como media \pm SD. † $p < 0,01$ vs controles; ‡ $p < 0,05$ vs controles.

Diversos trabajos llevados a cabo por el equipo del Dr. Such (Such *et al.*, 2002; Francés *et al.*, 2004; Francés *et al.*, 2005; Guarnier *et al.*, 2006; Francés *et al.*, 2007; Zapater *et al.*, 2008) han demostrado que la activación del sistema inmune característica de la cirrosis no está únicamente relacionada con la presencia de bacterias vivas, sino que el ADNbact también puede ser responsable de la activación de las células inmunitarias. Por ello, consideramos de gran interés determinar la presencia de fragmentos de ADNbact en los GLM mediante PCR.

En los GLM de las ratas controles no detectamos la presencia de ADNbact. Sin embargo, en 15 de las 28 ratas cirróticas analizadas (53.57%) sí detectamos ADNbact. Los microorganismos identificados tras la secuenciación de los nucleótidos obtenidos

mediante PCR fueron *E. coli* (73.3%), *Pseudomonas spp* (20%) y *Klebsiella* (6.6%), (Tabla 9).

Tabla 9. Detección e identificación de ADNbact en los GLM de ratas cirróticas compensadas y ratas control.

Ratas	Especie identificada en el GLM	
Cirrosis compensada (n=28)		
	n = 11	<i>E. coli</i>
	n = 3	<i>Pseudomonas spp.</i>
	n = 1	<i>Klebsiella</i>
	n = 13	negativo
Controles (n=20)		
	n = 20	negativo

Es de destacar que, al agrupar las ratas cirróticas en función de la presencia o no de ADNbact en su GLM, observamos una clara relación entre el número y estado de activación de las diferentes poblaciones celulares analizadas y dicho parámetro.

De hecho, las ratas cirróticas compensadas sin fragmentos bacterianos en el GLM presentaban un perfil inmunofenotípico similar al de las ratas control (Tabla 10), mientras que aquellas con presencia de ADNbact en los GLM mostraron un claro patrón de activación en las diferentes poblaciones del sistema inmune estudiadas (Tabla 10).

En concordancia con las diferencias fenotípicas encontradas en las ratas con cirrosis compensada en función de la presencia o no de fragmentos de ADNbact en su GLM, también pudimos comprobar que los niveles de las citoquinas proinflamatorias analizadas, IL-6 y TNF α , estaban significativamente elevados en los GLM con presencia de ADNbact (Figura 15).

Tabla 10. Número absoluto de células mononucleares presentes en los GLM de ratas cirróticas compensadas con y sin presencia de ADNbact y controles sanos.

	GLM (células/gangliox10 ⁻³)		
	Cirrosis compensada		Controles
	ADN bact (+) (n=15)	ADN bact (-) (n=13)	ADN bact (-) (n=20)
<i>Subpoblaciones celulares del sistema inmune</i>			
Células T (CD3+)	8537 ± 3649 ‡, Δ	6052 ± 3080	5208 ± 2890
Células T (CD4+CD8-)	6424 ± 2727 ‡, Δ	4820 ± 3161	3768 ± 1968
Células Th recientemente activadas (CD134+)	703 ± 403 †, Δ	391 ± 238	254 ± 160
Células Th memoria efectora (ThME, CD62L-)	1079 ± 205 ‡	1004 ± 688	809 ± 253
Células Tc (CD4-CD8+)	1804 ± 1005	1088 ± 636	1328 ± 801
Células Tc memoria efectora (TcME, CD62L-)	106 ± 23	97 ± 60	143 ± 68
Células NK-T (CD3+NK-RP1A^{medio+})	185 ± 83	98 ± 74	77 ± 65
Células B (CD45RA+)	7894 ± 3068 ‡, Δ	5164 ± 3392	3214 ± 1657
Células B activadas (CD80+)	194 ± 74 †, φ	92 ± 56	50 ± 60
Monocitos (CD3-CD45RA-NK-RP1A ^{brillante} -CD11b ^{brillante+})	118 ± 77 †, Δ	37 ± 27	17 ± 11
Monocitos inflamatorios (CD43-NK-RP1A ^{medio+})	75 ± 39 †, φ	10 ± 7	8 ± 5
Monocitos presentadores de antígeno (RT1B+)	96 ± 26 †, Δ	30 ± 14	13 ± 9
DCs (CD3-CD45RA-OX62+RT1B^{brillante+})	143 ± 69 †, Δ	60 ± 52	38 ± 27

Los datos se presentan como media ± SD. † p<0,01 vs controles; ‡ p<0,05 vs controles; φ p<0,01 vs cirrosis ADNbact (-); Δ p<0,05 vs cirrosis ADNbact (-);

8. Efecto de la decontaminación intestinal con antibióticos

Siguiendo con nuestro objetivo de determinar la implicación y/o aportación de las bacterias o sus productos bacterianos de origen entérico en la patogenia de la cirrosis compensada, procedimos a suprimir de forma selectiva el estímulo entérico de bacterias aerobias mediante la administración de antibióticos orales no absorbibles de amplio espectro a ratas cirróticas. Paralelamente, administramos agua como placebo a otro grupo de ratas cirróticas sin ascitis. La decontaminación intestinal redujo significativamente la carga fecal de bacterias aerobias en las ratas cirróticas tratadas con antibiótico (2.98 ± 1.32 logCFU/g heces), en comparación con aquellas tratadas con placebo (6.02 ± 0.29 logCFU/g heces), lo que demuestra la eficacia decontaminante de los antibióticos utilizados ($p<0.01$).

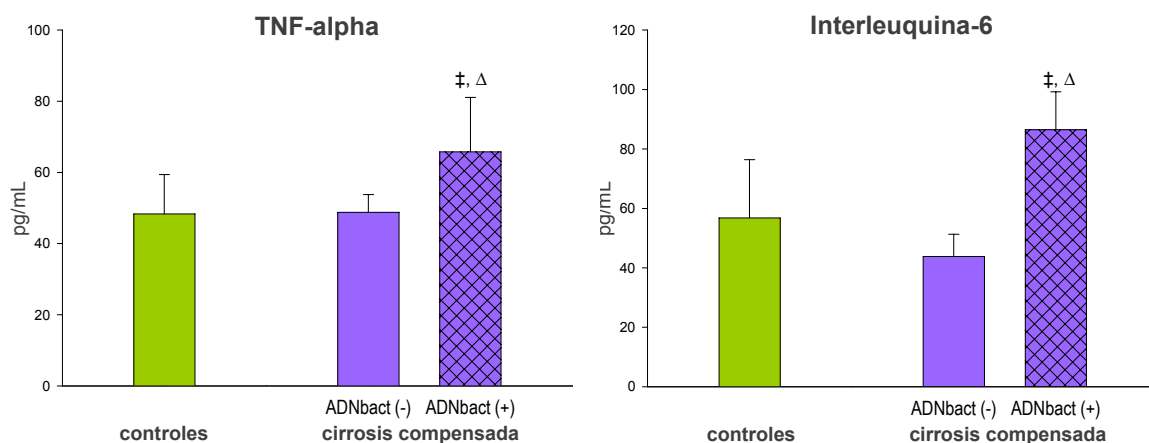


Figura 15. Valores de las citoquinas proinflamatorias, TNF α e IL-6, en los GLM de ratas control (■) y ratas cirróticas compensadas con (▨) y sin presencia (■) de ADNbact. Los datos se presentan como media \pm SD. ‡ $p < 0,05$ vs controles; Δ $p < 0,05$ vs cirrosis ADNbact (-);

La decontaminación intestinal con antibióticos también suprimió la presencia de ADNbact en los GLM. La supresión del estímulo bacteriano de origen entérico normalizó el número y el estado de activación de las células T, B, monocitos y DCs presentes en los GLM de las ratas cirróticas sin ascitis (**Tabla 11**) (**Figura 16**). Ello se tradujo en una reducción del tamaño del GLM, que pasó de 26.30 ± 14.67 mg en las ratas cirróticas tratadas con placebo a 18.73 ± 6.55 mg en las ratas cirróticas tratadas con antibióticos ($p < 0.05$).

A diferencia de lo que ocurre al administrar antibióticos a ratas cirróticas con ascitis (Muñoz *et al.*, 2005), la supresión del estímulo bacteriano de origen entérico sobre las células del sistema inmune del GLM de ratas con cirrosis compensada no tuvo ningún efecto sobre las células del sistema inmune circulantes (**Figura 16**) (**Tabla 11**), ni del GLH (**Figura 16**) (**Tabla 11**).

La retracción de las poblaciones de linfocitos T y monocitos activados en los GLM junto con la ausencia de cambios en las poblaciones de sangre periférica de las ratas cirróticas sin ascitis tratadas con antibióticos, sugieren que no existe relación entre el estímulo bacteriano de origen entérico y el estado de activación que presentan las células del sistema inmune en ambas localizaciones anatómicas en este modelo experimental de cirrosis compensada.

Tabla 11. Número absoluto de células mononucleares presentes en la sangre periférica, GLM y GLH de ratas con cirrosis compensada, tratadas con antibiótico o con placebo.

	Sangre periférica (células/ μ l)			GLM (células/gangliox 10^{-3})		GLH (células/gangliox 10^{-3})	
	Ratas cirróticas tratadas con placebo (n=7)	Ratas cirróticas tratadas con antibiótico (n=7)	Ratas cirróticas tratadas con placebo (n=7)	Ratas cirróticas tratadas con antibiótico (n=7)	Ratas cirróticas tratadas con placebo (n=7)	Ratas cirróticas tratadas con antibiótico (n=7)	Ratas cirróticas tratadas con placebo (n=7)
Subpoblaciones celulares del sistema inmune							
Células T (CD3+)	1411 \pm 424	1235 \pm 447	6417 \pm 3712	3111 \pm 1477 †	2631 \pm 1483	2783 \pm 1411	
Células Th (CD4+CD8-)	982 \pm 262	902 \pm 300	4765 \pm 2880	2390 \pm 1125 ‡	2109 \pm 1261	2274 \pm 1798	
Células Th recientemente activadas (CD134+)	99 \pm 57	94 \pm 60	501 \pm 357	155 \pm 90 *	349 \pm 164	376 \pm 193	
Células Th memoria efectora (ThME, CD62L-)	137 \pm 40	207 \pm 132	1791 \pm 796	598 \pm 230 ‡	905 \pm 513	847 \pm 412	
Células Tc (CD4-CD8+)	326 \pm 171	306 \pm 152	1426 \pm 594	669 \pm 344 ‡	451 \pm 204	426 \pm 498	
Células Tc memoria efectora (TcME, CD62L-)	32 \pm 18	36 \pm 45	255 \pm 151	72 \pm 31	57 \pm 46	24 \pm 14	
Células NK-T (CD3+NK-RP1A^{brillante+}_{medio+})	105 \pm 79	87 \pm 44	140 \pm 83	38 \pm 15 *	72 \pm 44	52 \pm 67	
Células B (CD45RA+)	925 \pm 380	903 \pm 438	5820 \pm 2495	2979 \pm 1216 †	1638 \pm 650	1321 \pm 854	
Células B activadas (CD80+)	30 \pm 19	26 \pm 14	175 \pm 110	55 \pm 30 *	67 \pm 31	55 \pm 48	
Monocitos (CD3-CD45RA-NK-RP1A ^{brillante} -CD11b ^{brillante+})	570 \pm 319	320 \pm 182	70 \pm 45	15 \pm 8 †	44 \pm 21	38 \pm 20	
Monocitos inflamatorios (CD43-NK-RP1A ^{medio+})	72 \pm 41	66 \pm 35	41 \pm 27	6 \pm 3 †	16 \pm 9	16 \pm 10	
DCs (CD3-CD45RA-OX62+RT1B^{brillante+})	15 \pm 7	14 \pm 6	119 \pm 72	29 \pm 17 †	64 \pm 38	90 \pm 46	

Los datos se presentan como media \pm SD. * p<0,001 vs placebo; † p<0,01 vs placebo; ‡ p<0,05 vs placebo.

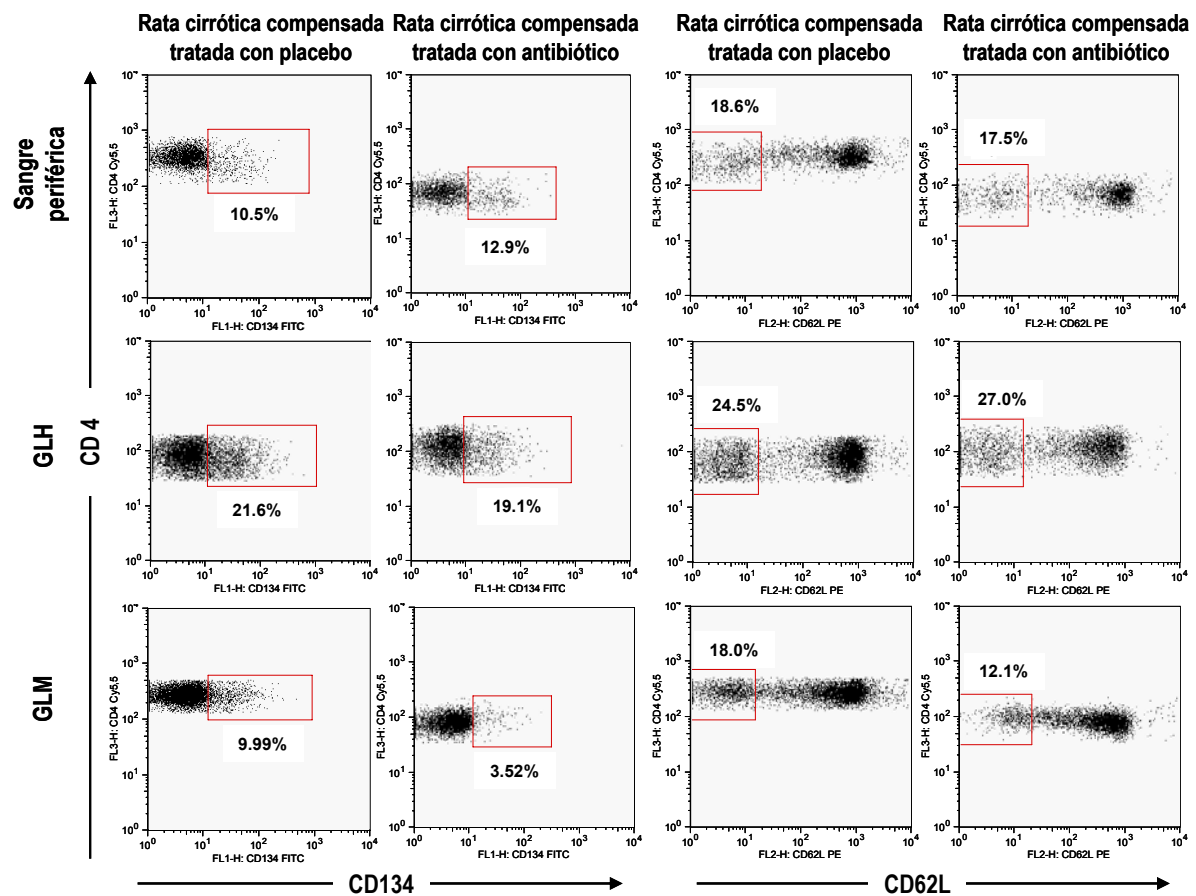


Figura 16. Células Th recientemente activadas (CD134+) y Th_{ME} (CD62L-) de una rata cirrótica tratada con placebo y una rata cirrótica tratada con antibióticos de amplio espectro representativas de cada grupo. Los gráficos de puntos representan los porcentajes de células Th de la sangre periférica, los GLH y los GLM que expresan el marcador CD134 o han perdido el CD62L

9. Correlación del grado de activación de las células del sistema inmune en los diferentes compartimentos anatómicos de las ratas cirróticas

En primer lugar, realizamos estudios de correlación que establecieron la existencia de una correlación directa y significativa entre la distribución celular en los GLH y la sangre circulante para las poblaciones de células Th ($r=0.58$, $p<0.01$) y monocitos ($r=0.73$, $p<0.01$), así como sus respectivas subpoblaciones activadas, las células Th que expresan el marcador de CD134 ($r=0.59$, $p<0.01$) y los monocitos inflamatorios ($r=0.64$, $p<0.01$), (**Figura 17**).

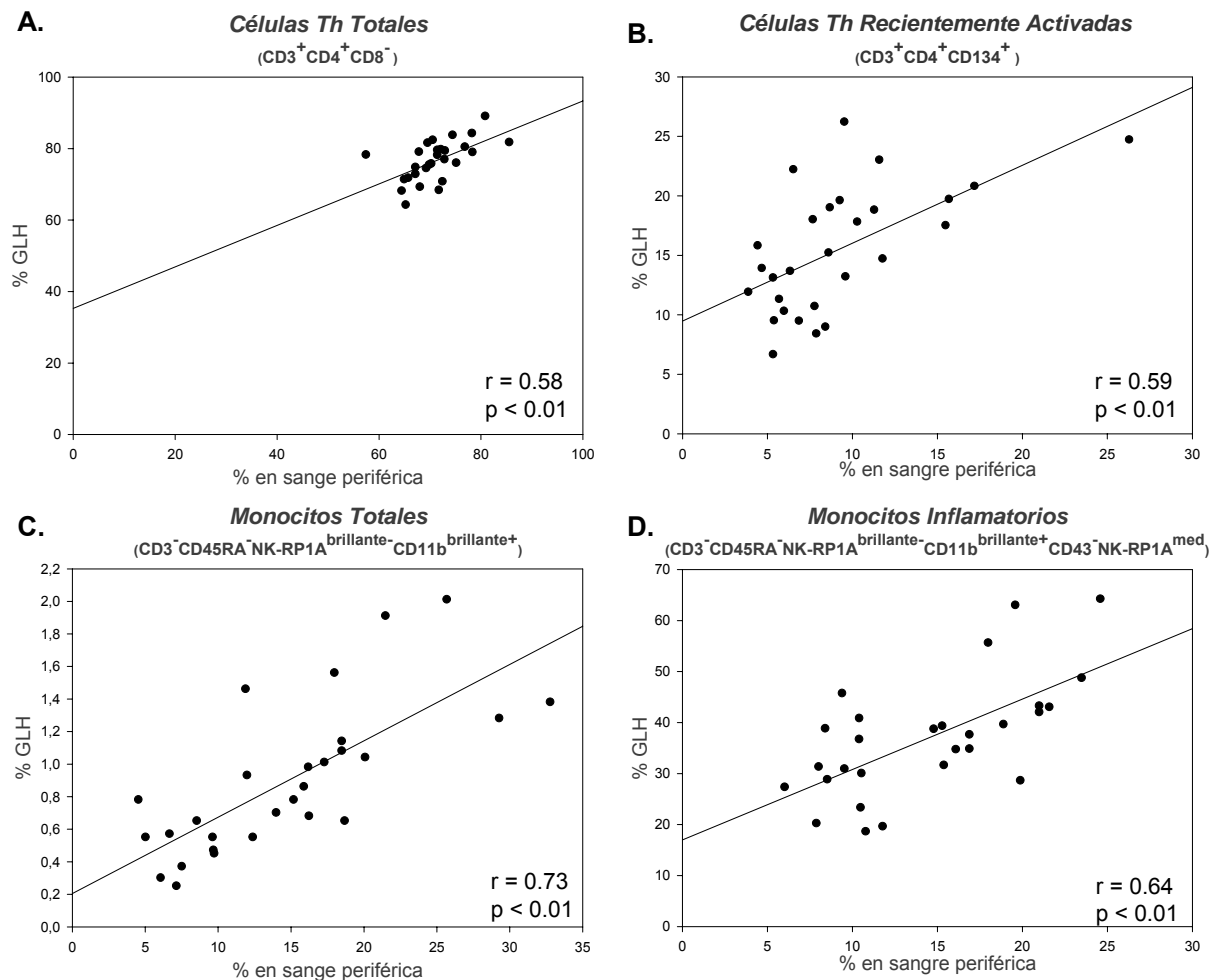


Figura 17. Correlación entre la distribución de las poblaciones generales de células Th (A) y monocitos (C), y sus respectivas subpoblaciones activadas, Th CD134+ (B), y monocitos inflamatorios (D) presentes en los GLH y en la sangre periférica de las ratas con cirrosis compensada.

En segundo lugar, analizamos el estado de activación de las células inmunitarias circulantes en sangre periférica en función de la presencia de ADNbact en sus respectivos GLM. Al agrupar de este modo los datos fenotípicos de sangre periférica de las ratas cirróticas compensadas, observamos un claro incremento en el número y estado de activación, tanto de las células T como de las APCs (células B, DCs y monocitos) en ambos grupos de ratas con cirrosis, independientemente de la presencia o no de fragmentos génicos de origen bacterianos en sus respectivos GLM, (Tabla 12).

Tabla 12. Número absoluto de células mononucleares presentes en la sangre periférica de ratas cirróticas compensadas con y sin presencia de ADNbact y controles sanos.

	Sangre periférica (células/ μ l)		
	Cirrosis compensada		Controles
	ADN bact (+) (n=15)	ADN bact (-) (n=13)	ADN bact (-) (n=20)
Subpoblaciones celulares del sistema inmune			
Células T (CD3+)	1435 \pm 514 ‡	1254 \pm 436	1087 \pm 522
Células Th (CD4+CD8-)	1021 \pm 337 ‡	985 \pm 261	761 \pm 359
Células Th recientemente activadas (CD134+)	102 \pm 84 *	78 \pm 32 *	17 \pm 11
Células Th memoria efectora (ThME, CD62L-)	146 \pm 56 ‡	146 \pm 24 ‡	66 \pm 41
Células Tc (CD4-CD8+)	371 \pm 167	388 \pm 226	293 \pm 164
Células Tc memoria efectora (TcME, CD62L-)	74 \pm 51	98 \pm 119	32 \pm 20
Células NK-T (CD3+NK-RP1A^{medio+})	115 \pm 73	138 \pm 108	139 \pm 67
Células B (CD45RA+)	962 \pm 433 ‡	805 \pm 420	580 \pm 345
Células B activadas (CD80+)	27 \pm 16 †	18 \pm 2	10 \pm 7
Monocitos	624 \pm 458 †	628 \pm 380 †	126 \pm 70
(CD3-CD45RA-NK-RP1A ^{brillante} -CD11b ^{brillante+})			
Monocitos inflamatorios (CD43-NK-RP1A ^{medio+})	83 \pm 61 †	79 \pm 25 †	30 \pm 17
Monocitos presentadores de antígeno (RT1B+)	95 \pm 44 †	59 \pm 47 †	18 \pm 15
DCs (CD3-CD45RA-OX62+RT1B^{brillante+})	8 \pm 5	7 \pm 1	5 \pm 6

Los datos se presentan como media \pm SD. * $p < 0,001$ vs controles; † $p < 0,01$ vs controles; ‡ $p < 0,05$ vs controles;

10. Efecto de la administración de CCl₄ a corto plazo en las células del sistema inmune

Con el fin de verificar si las modificaciones observadas en la cirrosis compensada a nivel inmunológico en los diferentes compartimentos estudiados (sangre periférica, GLM y GLH) están originadas por el curso evolutivo de la enfermedad y no por un efecto directo de la administración oral del CCl₄, administramos durante 3 semanas el tóxico a un pequeño grupo de ratas (n=5) y analizamos el patrón de activación que presentaban las células mononucleares.

Las principales subpoblaciones de células Th activadas, aquellas recientemente activadas, y las Th_{ME}, en la sangre circulante de las ratas que recibieron esta dosis no presentaron diferencias estadísticamente significativas con respecto a las ratas control

ni en la distribución (**Figura 18**) ni en los números absolutos (Th CD134+, 16 ± 8 vs. 13 ± 7 cels/ μ L, n.s. y Th CD62L-, 53 ± 3 vs. 47 ± 11 cels/ μ L, n.s.), así como tampoco los monocitos inflamatorios circulantes (monocitos CD43-NK-RP1A^{medio}+, 30 ± 6 vs. 31 ± 12 cels/ μ L, n.s.), (**Tabla 13**).

Del mismo modo que a nivel sistémico, el patrón de activación de las células mononucleares de los GLM no presentó diferencias con respecto a las ratas control ni en la distribución (**Figura 18**) ni en los números absolutos (Th CD134+, 219 ± 44 vs. 206 ± 168 cels/ganglio $\times 10^{-3}$, n.s.; Th CD62L-, 718 ± 362 vs. 735 ± 261 cels/ganglio $\times 10^{-3}$, n.s. y monocitos CD43-NK-RP1A^{medio}+, 9 ± 3 vs. 9 ± 6 cels/ganglio $\times 10^{-3}$, n.s.), (**Tabla 13**).

A diferencia de lo que ocurre en los dos compartimentos anteriores, el GLH de las ratas tratadas con CCl₄ durante 3 semanas mostró una discreta expansión del número de células inmunes activadas (Th CD134+, 101 ± 47 vs. 50 ± 16 cels/ganglio $\times 10^{-3}$, $p < 0.05$.; Th CD62L-, 457 ± 312 vs. 185 ± 72 cels/ganglio $\times 10^{-3}$, $p < 0.05$. y monocitos CD43-NK-RP1A^{medio}+, 8 ± 4 vs. 3 ± 1 cels/ganglio $\times 10^{-3}$, $p < 0.05$), (**Tabla 13**).

Tabla 13. Número absoluto de células mononucleares presentes en la sangre periférica, GLM y GLH de controles sanos y ratas tras 3 dosis de 20µL de CCl₄

	Sangre periférica (células/µl)			GLM (células/ganglio $\times 10^{-3}$)		GLH (células/ganglio $\times 10^{-3}$)	
	Ratas con 3 dosis de CCl ₄ (n=5)	Controles (n=5)	Ratas con 3 dosis de CCl ₄ (n=5)	Controles (n=5)	Ratas con 3 dosis de CCl ₄ (n=5)	Controles (n=5)	Controles (n=5)
Subpoblaciones celulares del sistema inmune							
Células T (CD3+)	1114 ± 430	1017 ± 215	4273 ± 912	3892 ± 2565	2344 ± 1796	1324 ± 552	
Células Th (CD4+CD8-)	837 ± 329	757 ± 185	3264 ± 743	2694 ± 1722	1845 ± 1433 ‡	993 ± 470	
Células Th recientemente activadas (CD134+)	16 ± 8	13 ± 7	219 ± 44	206 ± 168	101 ± 47 ‡	50 ± 16	
Células Th memoria efectora (ThME, CD62L-)	53 ± 3	47 ± 11	718 ± 362	735 ± 261	457 ± 312 ‡	185 ± 72	
Células Tc (CD4-CD8+)	258 ± 96	207 ± 39	994 ± 587	1094 ± 559	448 ± 231	303 ± 87	
Células Tc memoria efectora (TcME, CD62L-)	46 ± 2	36 ± 5	112 ± 47	128 ± 70	66 ± 49	34 ± 16	
Células B (CD45RA+)	684 ± 352	515 ± 249	2242 ± 858	2099 ± 1482	732 ± 484	580 ± 287	
Células B activadas (CD80+)	15 ± 9	8 ± 6	42 ± 18	31 ± 15	36 ± 14 ‡	16 ± 9	
Monocitos (CD3-CD45RA-NK-RP1A ^{brillante+} -CD11b ^{brillante+})	105 ± 12	112 ± 34	16 ± 7	12 ± 4	12 ± 7	6 ± 3	
Monocitos inflamatorios (CD43-NK-RP1A ^{medio+})	30 ± 6	31 ± 12	9 ± 3	9 ± 6	8 ± 4 ‡	3 ± 1	
DCs (CD3-CD45RA-OX62+RT1B ^{brillante+})	6 ± 2	6 ± 4	33 ± 25	32 ± 26	21 ± 11 ‡	7 ± 2	

Los datos se presentan como media ± SD. ‡ p<0,05 vs controles;

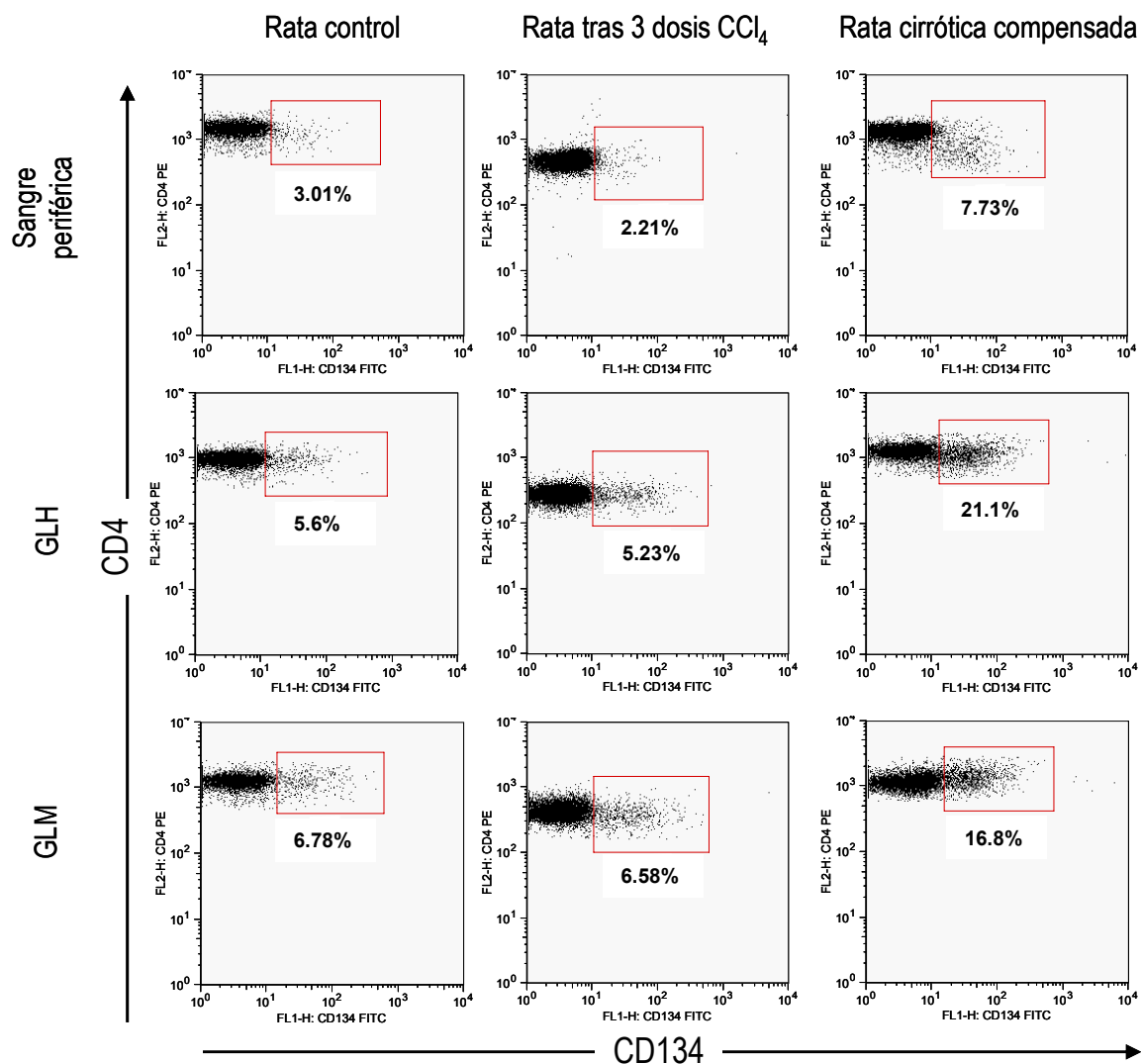


Figura 18. Células Th activadas recientemente (CD134+) de una rata control, una rata tras 3 semanas tratamiento con CCl₄ y una rata con cirrosis compensada, representativas de cada grupo. Los gráficos de puntos representan los porcentajes de células Th de la sangre periférica, los GLH y los GLM positivas para el marcador CD134.

DISCUSIÓN

Los resultados de este estudio experimental demuestran la existencia de una activación del sistema inmune proinflamatorio a nivel sistémico en ratas con cirrosis previa a la aparición de la ascitis, tal y como lo demuestra la expansión y activación de las células T, B y monocitos en la sangre periférica de estos animales. Dicho estado proinflamatorio es concurrente con la expansión y activación de células T y monocitos en los GLH, lo que sugiere que, en este estado evolutivo de la enfermedad, estos ganglios linfoides secundarios constituyen la principal fuente de activación de las células inmunes circulantes.

Nuestros resultados revelan además el papel patogénico que juegan las bacterias entéricas en esta fase temprana de la cirrosis, como se determina por la presencia de ADN_{bact} en los GLM, pero que en nuestras ratas cirróticas sin ascitis desencadenan una respuesta inflamatoria restringida al entorno local, puesto que la decontaminación intestinal selectiva con antibióticos redujo la expansión de los monocitos y de los linfocitos Th activados en el GLM, sin modificar el estado proinflamatorio a nivel hepático ni sistémico.

1. Expansión y activación de las células del sistema inmune de sangre periférica en ratas con cirrosis compensada

Hemos testado la hipótesis de que la activación sistémica del sistema inmune inflamatorio ocurre en la fase compensada, pre-ascítica, de la cirrosis experimental y que esta activación inmune podría comenzar en los ganglios linfáticos que drenan al hígado y/o el intestino.

Esta fase del modelo experimental de cirrosis por CCl₄ no está caracterizada inmunológicamente, por lo que el estudio de la distribución y estado de activación de las poblaciones de células inmunitarias circulantes y su producción de citoquinas representa un objetivo en sí mismo. La primera parte de nuestra hipótesis queda demostrada al comprobar las anomalías en la distribución y estado de activación de las células del sistema inmune a nivel sistémico en las tres poblaciones principales analizadas, células T, B y monocitos.

El aumento en el número de células circulantes ocurrió fundamentalmente a expensas de subpoblaciones que expresan en su superficie moléculas relacionadas con su estado de activación. Así, observamos una intensa expansión en sangre periférica de

las células Th_{ME} (CD3+CD4+CD62L-) y las recientemente activadas (CD3+CD4+CD134+), así como de los monocitos inflamatorios (CD3-CD45RA-NK-RP1A^{brillante}-CD11b^{brillante}+CD43-NK-RP1A^{medio}+).

Junto con el incremento de células Th y monocitos activados en la sangre periférica de las ratas cirróticas compensadas, el incremento en suero de los niveles de citoquinas proinflamatorias (IL-6 y TNFα) es consistente con la activación del sistema inmune inflamatorio. Ello demuestra que el estado proinflamatorio sistémico característico de la cirrosis es un evento temprano en el desarrollo de la enfermedad y que no está ligado a la aparición de manifestaciones clínicas como la ascitis.

Estos datos están en concordancia con el limitado número de trabajos que muestran una expansión de los monocitos activados y concentraciones aumentadas de citoquinas proinflamatorias en la sangre periférica de pacientes con cirrosis compensada (Albillos *et al.*, 2004b; Kakumu *et al.*, 1997; Tilg *et al.*, 1992; Devière *et al.*, 1990), pero hasta la fecha no se habían demostrado en cirrosis experimental.

2. Expansión y activación de las células del sistema inmune de los GLH y GLM en ratas con cirrosis compensada

Nuestras ratas cirróticas sin ascitis presentaron una clara adenopatía a nivel hepático y mesentérico, como consecuencia de la expansión de las células del sistema inmune analizadas, células T, B, monocitos y dendríticas, junto con profundas anomalías en su distribución y estado de activación.

El aumento en el número de células ocurrió fundamentalmente a expensas de subpoblaciones que expresan en su superficie moléculas relacionadas con el estado de activación. Así, observamos un aumento en el número de células Th que habían sufrido una activación reciente (CD3+CD4+CD134+) y de las Th_{ME}, aquellas que, al activarse, internalizaron el CD62L (CD3+CD4+CD62L-). Dentro de esta población Th_{ME}, las que presentan mayor capacidad para producir citoquinas, las células no terminadas (Th_{ME nT}; CD3+CD4+CD62L-CD45RC-) también se encontraron claramente expandidas en ambos territorios. Los monocitos también mostraron signos de activación, como lo demuestra la expansión de la población con capacidad presentadora de antígeno (RT1B+) y los denominados inflamatorios (CD43-NK-RP1A^{medio}+).

El aumento en el número de células T observado en ambos ganglios linfáticos de las ratas cirróticas se acompañó de una expansión de las células B. Esto sugiere que las células B dejan de recircular por los ganglios linfáticos cuando encuentran su antígeno específico, quedando allí retenidas. La interacción con las células Th activadas va a favorecer la activación de las células B, estableciéndose así lo que se conoce como un foco primario de expansión clonal, en el que ambos tipos de linfocitos proliferan (Janeway *et al.*, 2004).

Es importante destacar que, a pesar de que ambos ganglios linfáticos se encontraron activados, el GLH de las ratas cirróticas sin ascitis mostró un mayor grado de activación, como lo demuestra el mayor incremento de las subpoblaciones celulares activadas. Así, la población de células Th CD134+ estaba aumentada 5 veces en el GLH de las ratas cirróticas, mientras que en los GLM no llegó a duplicarse; las Th_{ME} (CD62L-) aumentaron 4 veces en los GLH y tan solo el doble en los GLM, y los monocitos inflamatorios, que se incrementaron 6 veces en los GLH, no llegan a ser 5 veces superiores en los GLM de las ratas con cirrosis compensada.

La expansión y activación de las poblaciones de células T y B encontrada en los GLH y GLM en este modelo experimental de cirrosis compensada indica que la respuesta inmune a este nivel no afecta sólo a APCs con capacidad fagocítica, encargadas de ejercer la respuesta innata, sino también a otras poblaciones celulares que participan en la respuesta inmune adquirida.

3. Relevancia patogénica de la TBI en la fase compensada de la cirrosis

Nuestra demostración del paso de fragmentos de ADN_{bact} hacia los GLM de las ratas con cirrosis compensada es uno de los hallazgos principales del presente estudio. Hasta la fecha, la presencia de bacterias viables (cultivo microbiológico positivo) o no viables (fragmentos de ADN_{bact}) en el GLM sólo ha sido descrita en ratas cirróticas con ascitis (García-Tsao *et al.*, 1995; Pérez-Páramo *et al.*, 2000; Albillos *et al.*, 2005; Guarner *et al.*, 2006). De forma similar, el paso de productos bacterianos al torrente circulatorio, como se observa por el incremento en suero de LBP o la presencia de ADN_{bact} en suero, sólo ha sido demostrado en modelos experimentales o pacientes con cirrosis descompensada (Chu *et al.*, 1997; Such *et al.*, 2002; Albillos *et al.*, 2003; Guarner *et al.*, 2006; González-Navajas *et al.*, 2008). En el grupo de cirrosis con ascitis, la TBI es el resultado del

sobrecrecimiento de bacterias intestinales, la alteración de la permeabilidad intestinal, y probablemente, una inmunidad intestinal anómala, que sea incapaz de eliminar a los microorganismos traslocados (Pérez-Páramo *et al.*, 2000; Albillos *et al.*, 2002; Guarner *et al.*, 2006). La detección de fragmentos del genoma bacteriano y no de bacterias vivas en los GLM de nuestras ratas con cirrosis compensada indica que los mecanismos que permiten el paso de las bacterias entéricas hacia los GLM son también operativos en la fase compensada de la cirrosis experimental. Sin embargo, y en contraste con la situación que se produce en las ratas cirróticas con ascitis, el sistema inmune intestinal es funcional y por ende, competente para evitar el crecimiento de las bacterias.

El ADNbact tiene secuencias específicas de dinucleótidos no metilados, los motivos CpG, capaces de provocar una respuesta inmune inflamatoria en los mamíferos (Krieg, 2002). A diferencia del LPS de la membrana bacteriana, que induce la respuesta inmune a través de su interacción con el TLR4 (Chow *et al.*, 1999; Medzhitov *et al.*, 2000), los motivos CpG del ADNbact inducen una fuerte respuesta inflamatoria tipo Th1 mediada por el TLR9, estimulando la síntesis de citoquinas proinflamatorias como el TNF α y/o el IFN γ por parte de células NK, macrófagos y células dendríticas (Cowdery *et al.*, 1996; Sweet *et al.*, 1998; Hemmi *et al.*, 2000; Wagner *et al.*, 2002). La relevancia de estos patrones de ADNbact ya ha sido previamente demostrada en la patología de la cirrosis con ascitis (Such *et al.*, 2002; Francés *et al.*, 2004; Francés *et al.*, 2005; Guarner *et al.*, 2006; Francés *et al.*, 2007; Zapater *et al.*, 2008; El-Naggar *et al.*, 2008). Es importante destacar que en nuestro trabajo, la presencia de ADNbact en los GLM de las ratas cirróticas sin ascitis también correlaciona con la expansión de las células mononucleares activadas en este ganglio, así como con la producción de citoquinas proinflamatorias (IL-6 y TNF α).

La estrategia experimental que seguimos para contrastar esta hipótesis fue estudiar las células del sistema inmune de las ratas cirróticas sin ascitis tras la supresión del estímulo bacteriano de origen entérico. Para ello, administramos antibióticos orales no absorbibles de amplio espectro activos frente a bacterias Gram negativas (los microorganismos predominantes en la flora intestinal y que translocan con mayor frecuencia en las ratas cirróticas (Runyon *et al.*, 1991; Llovet *et al.*, 1994; Runyon *et al.*, 1994)), como el norfloxacin, y frente a bacterias Gram positivas, como la vancomicina. La eficacia microbicida de este tratamiento quedó demostrada al constatar una disminución de la carga fecal y la ausencia de ADNbact en los GLM en las ratas con cirrosis compensada que lo recibieron.

La eliminación del estímulo bacteriano de origen entérico normalizó las alteraciones en la distribución celular y los signos de activación del sistema inmune en el GLM, a nivel local, pero sin repercusión en el GLH ni en la sangre periférica, es decir, a nivel sistémico. Así, las ratas cirróticas sin ascitis que recibieron tratamiento antibiótico únicamente mostraron un descenso en el número de células T, B y monocitos activados residentes en los GLM (Th CD134+; Th CD62L-; B CD80+; monocitos CD43-NK-RP1A^{medio}+).

Por tanto, de la ausencia de correlación entre la expansión de las células inmunes activadas a nivel sistémico y la presencia de ADN_{bact} en los GLM, junto con el efecto de la decontaminación intestinal con antibióticos, se deduce que el sistema inmune mesentérico de las ratas con cirrosis compensada es capaz de mantener la respuesta inflamatoria a un nivel local sin repercusión a nivel sistémico.

4. El estado proinflamatorio sistémico característico de la cirrosis compensada se inicia en el territorio hepático

Esta hipótesis está experimentalmente dirigida teniendo en cuenta el modelo establecido de respuesta innata y adaptativa. De acuerdo con este modelo, la respuesta inmune adaptativa comienza cuando las DCs y otras APCs presentan los antígenos capturados a los linfocitos T vírgenes que están en los ganglios linfáticos. Tras el encuentro con el antígeno en los ganglios linfáticos, los linfocitos T se expanden clonalmente y se diferencian en células efectoras tras la expresión de determinadas moléculas y la pérdida de otras, como la L-selectina, lo que les permite alcanzar la sangre y desde ahí dirigirse a los tejidos periféricos inflamados (Von Andrian *et al.*, 2000). Una fuente potencial de antígenos en la cirrosis es el propio hígado, como órgano diana de inflamación, así como el intestino, a través del cual pasan las bacterias entéricas (Muñoz *et al.*, 2005; Pérez-Páramo *et al.*, 2000).

Por su parte, el sistema inmune innato juega un papel importante en la respuesta inmune ya que células de origen mieloide como los monocitos pueden fagocitar material extraño, presentarlo a las células T y producir citoquinas proinflamatorias. Los monocitos circulantes en la sangre periférica son una población heterogénea de células residentes e inflamatorias capaces de extravasar a los tejidos dando lugar a células especializadas, o migrar a tejidos inflamados, respectivamente (Steiniger *et al.*, 2001; Yrlid *et al.*, 2006; Geissmann *et al.*, 2003).

Como ocurre en otros tejidos, la respuesta del sistema inmune a los antígenos hepáticos tiene lugar predominantemente en los ganglios linfoides regionales, en este caso, los GLH. Las células inmunes, una vez activadas, abandonan los GLH y recirculan para poder acceder al hígado inflamado (Oo *et al.*, 2010). Prueba de ello en nuestro trabajo es la correlación directa observada entre las células Th activadas y los monocitos inflamatorios circulantes con dichas poblaciones presentes en los GLH y la ausencia de esta correlación en el hígado.

Trabajos previos realizados por nuestro grupo en ratas cirróticas con ascitis identificaron el GLM como la fuente principal de activación del sistema inmune al interaccionar con las bacterias de origen entérico. Estas células inmunitarias activadas en el GLM se expandían y alcanzaban posteriormente la sangre periférica por recirculación (Muñoz *et al.*, 2005). Esto contrasta con la situación encontrada en nuestro actual trabajo en ratas con cirrosis sin ascitis, donde la recirculación de las células inmunes activadas en los GLH, y no en los GLM, parece ser la fuente principal de las células activadas del sistema inmune presentes en la sangre. Este punto de vista se sustenta, en primer lugar, en el hecho de que los antibióticos no absorbibles administrados a las ratas con cirrosis compensada devuelven la respuesta proinflamatoria a niveles basales en el GLM, pero no en GLH ni en la sangre periférica, y, en segundo lugar, en la existencia de una correlación directa entre las células Th recientemente activadas y los monocitos inflamatorios presentes en la sangre periférica y los GLH.

De este modo, las células inmunitarias activadas que abandonan el GLH y recirculan por la sangre periférica explican la activación inmune observada en las ratas con cirrosis compensada.

5. Cirrosis por CCl₄ en rata: un modelo para el estudio de las alteraciones del sistema inmune en la cirrosis

En el modelo experimental empleado en este estudio, la inducción de cirrosis compensada en rata se realiza mediante la administración intragástrica semanal de CCl₄ (Proctor *et al.*, 1982; Runyon *et al.*, 1991). A largo plazo, este modelo reproduce algunas de las características más relevantes de la cirrosis humana, como la hipertensión portal, el síndrome de circulación hiperdinámica, la formación de ascitis y la TBI a los GLM (Vorobioff *et al.*, 1983; Vorobioff *et al.*, 1984; Fernández-Muñoz *et al.*, 1985; Jiménez *et al.*, 1985;

Caramelo *et al.*, 1986; Reichen *et al.*, 1988; Jiménez *et al.*, 1992; Llovet *et al.*, 1994; García-Tsao *et al.*, 1995; Casafont *et al.*, 1997).

Este modelo de CCl₄ ha sido una herramienta de gran utilidad para determinar tanto los mecanismos patogénicos de la cirrosis como para la caracterización de sus alteraciones inmunológicas (Muñoz *et al.*, 2005), debido a su gran paralelismo con el estado proinflamatorio sistémico descrito en pacientes (Albillos *et al.*, 2004b), lo que demuestra la validez del modelo.

Es importante destacar que a diferencia de otros hepatotóxicos, el CCl₄ no es tóxico *per se*, sino que sus efectos tóxicos son atribuibles a la generación del radical reactivo triclorometil tras ser metabolizado por la citocromo P4502E1, lo que produce la peroxidación lipídica y el daño hepático celular (Manibusan *et al.*, 2007; Wong *et al.*, 1998). La intoxicación con CCl₄ daña los hepatocitos de forma secuencial, provocando un daño hepático agudo (2-3 semanas de intoxicación) con necrosis e inflamación y fibrosis (4-6 semanas), que desemboca en la conexión de las estructuras vasculares que alimentan y drenan los sinusoides hepáticos, desarrollando cirrosis a las 8-12 semanas del tratamiento (Tamayo., 1983; Tsukamoto *et al.*, 1990; Constandinou *et al.*, 2005). El daño hepático es pues atribuible a la respuesta inflamatoria que se origina por los radicales libres formados en el hígado por el metabolismo del CCl₄ y la activación simultánea de las células no parenquimales (Williams *et al.*, 1990).

Es más, independientemente de la especie a la que se le administre (rata o ratón) o de la vía de administración (intragástrica, oral, intraperitoneal...), está ampliamente documentado que, transcurridas entre 8 y 12 semanas, los animales desarrollan una cirrosis bien establecida (Cabre *et al.*, 2000; Clària *et al.*, 2005; Constandinou *et al.*, 2005; Chang *et al.*, 2005; Domenicali *et al.*, 2009; Sobrevals *et al.*, 2010)

El hecho de que el CCl₄ sólo pueda ser metabolizado por la citocromo P4502E1, presente únicamente en hígado, sirve también para descartar que la administración intragástrica del CCl₄ pueda ser dañina para la mucosa del tracto gastrointestinal, incrementando su permeabilidad y/o favoreciendo el paso de enterobacterias a los GLM por un mecanismo diferente al de la cirrosis, previo a la aparición de ascitis. De hecho ya está demostrado que la administración intragástrica de 3 dosis de CCl₄ no causa cambios significativos en la histología, la permeabilidad o la motilidad intestinal en ratas Sprague-Dawley (LLovet *et al.*, 1994, Albillos *et al.*, 2001b).

No obstante, dado que tratamos de demostrar la existencia de inflamación en fases tempranas en la evolución de la cirrosis, caracterizamos el estado de activación de las células del sistema inmune en sangre, GLM y GLH, tras la administración intragástrica de 3 únicas dosis de CCl₄, para descartar un posible efecto directo del tóxico.

La inflamación observada en nuestro modelo experimental a nivel sistémico se puede atribuir a la cirrosis y no a una respuesta inflamatoria del hígado a la administración del CCl₄ por 3 razones fundamentales:

i) No hay anomalías sistémicas en el sistema inmunológico después de un corto curso de CCl₄ intragástrico. El fenotipo y estado de activación de las distintas subpoblaciones celulares de sangre periférica no mostraron cambios estadísticamente significativos. Está demostrado que una única dosis de CCl₄ puede conducir a daño hepático agudo, caracterizado por esteatosis, necrosis y apoptosis hepatocitaria (Tamayo., 1983; Hartley *et al.*, 1999, Iredale *et al.*, 1998), sin embargo, se necesitan al menos 4 semanas de administración del tóxico para que se desarrolle la fibrosis hepática (Iredale *et al.*, 1998; Teixeira *et al.*, 2006). Tras la administración durante 3 semanas del CCl₄ observamos una respuesta inflamatoria leve en el GLH, pero no en el GLM o la sangre periférica. Este hallazgo coincide con los resultados de otros laboratorios que indican ausencia de daños en la pared intestinal, sin TBI, en ratas que recibieron un corto tratamiento de CCl₄ por vía oral (LLovet *et al.*, 1994). La ligera activación de las células Th de los GLH corrobora, una vez más, el efecto hepático localizado del CCl₄ tras ser metabolizado por la citocromo P450E1. Es más, la incipiente activación de las células mononucleares residentes de los GLH en fases tan tempranas del tratamiento con CCl₄ apoya el papel de estos ganglios como primer foco en el que se activan las células inmunitarias en la cirrosis.

ii) La inflamación sistémica en otros modelos experimentales de cirrosis, como la cirrosis biliar, proporciona apoyo adicional, ya que une la respuesta inflamatoria detectada en la sangre periférica con el desarrollo de la cirrosis y no con la toxicidad del CCl₄. De hecho, la activación de los monocitos circulantes y de las células Th se ha demostrado en ratones y ratas con cirrosis inducida por la ligadura de los conductos biliares (Kerfoot *et al.*, 2006; Albillos *et al.*, 2010)

iii) La falta de transaminitis significativa en nuestras ratas con cirrosis, indicativo de inflamación severa y necrosis hepatocelular, habría debilitado nuestro modelo y el vínculo propuesto entre la inflamación sistémica y cirrosis.

CONCLUSIONES

Los resultados del presente estudio realizado en ratas con cirrosis compensada inducida por CCl₄ permiten concluir que:

1. La expansión en sangre periférica de células activadas del sistema inmune (linfocitos T y monocitos) y el aumento en el nivel de citoquinas proinflamatorias circulantes se observa desde la fase compensada de la cirrosis experimental.
2. La activación de las células T y monocitos en ratas con cirrosis compensada coexiste en el compartimento sanguíneo y en los ganglios de drenaje del hígado (GLH) y del intestino (GLM).
3. El paso de productos bacterianos de origen entérico desde la luz intestinal a los ganglios linfáticos mesentéricos ocurre desde la fase compensada de la cirrosis experimental, en los que genera una respuesta inflamatoria de ámbito local.
4. La activación de las células del sistema inmune en los ganglios de drenaje del hígado es la principal fuente de inflamación sistémica en las ratas con cirrosis compensada.

BIBLIOGRAFÍA

1. Adams DH, Eksteen B, Curbishley SM. Immunology of the gut and liver: a love/hate relationship. *Gut*. 2008;57:838-48.
2. a. Albillos A, de la Hera A, Alvarez-Mon M. Pathogenic effects of bacterial translocation in liver cirrhosis. *Gastroenterol Hepatol*. 2001;24:450-3.
3. b. Albillos A, Pérez-Páramo M, Muñoz J. Prokinetics reduce bacterial translocation in cirrhosis: Will sweeping the gut keep the fluid clean? *Gastroenterology*. 2001;120:314-5.
4. Albillos A, de la Hera A. Multifactorial gut barrier failure in cirrhosis and bacterial translocation: working out the role of probiotics and antioxidants. *J Hepatol* 2002;37:523-6.
5. Albillos A, de la Hera A, Gonzalez M, Moya JL, Calleja JL, Monserrat J, Ruiz-del-Arbol L, Alvarez-Mon M. Increased lipopolysaccharide binding protein in cirrhotic patients with marked immune and hemodynamic derangement. *Hepatology* 2003;37:208-17.
6. a. Albillos A, de-la-Hera A, Alvarez-Mon M. Serum lipopolysaccharide-binding protein prediction of severe bacterial infection in cirrhotic patients with ascites. *Lancet*. 2004 15;363:1608-10.
7. b. Albillos A, de la Hera, Reyes E, Monserrat J, Muñoz L, Nieto M, Prieto A, Sanz E, Alvarez-Mon M. Tumour necrosis factor-alpha expression by activated monocytes and altered T-cell homeostasis in ascitic alcoholic cirrhosis: amelioration with norfloxacin. *J Hepatol* 2004;40:624-31.
8. Albillos A, de la Hera A, Alvarez-Mon M. Experimental models of spontaneous bacterial peritonitis. In: Ginés P, Arroyo V, Rodés J, Schrier RW, eds. *Ascites and renal dysfunction in liver disease*. Oxford: Blackwell Publishing, 2005:411-21.
9. Albillos A, Nieto M, Ubeda M, Muñoz L, Fraile B, Reyes E, Lledó L, Blanco I, Pastor O, Salas C, Lario M, Monserrat J, Bataller R, Alvarez-Mon M. The biological response modifier AM3 attenuates the inflammatory cell response and hepatic fibrosis in rats with biliary cirrhosis. *Gut* 2010;59:943-952.
10. Anthony PP, Ishak KG, Nayak NC, Poulsen HE, Scheuer PJ, Sobin LH. The morphology of cirrhosis: definition, nomenclature, and classification. *Bull World Health Organ* 1977;55:521-40.
11. Aoyama T, Paik YH, Seki E. Toll-like receptor signaling and liver fibrosis. *Gastroenterol Res Pract*. 2010. Epub 2010 Jul 25.
12. Bataller R, Brenner DA. Liver fibrosis. *J Clin Invest*. 2005;115:209-18.
13. Berg RD, Garlington AW. Translocation of certain indigenous bacteria from the gastrointestinal tract to the mesenteric lymph nodes and other organs in a gnotobiotic mouse model. *Infect Immun*. 1979;23:403-11.
14. Beutler B. Innate immunity: an overview. *Molecular Immunology* 2004;40:845-859.
15. Bosch J. Enfermedades del aparato digestivo: hepatología. Hipertensión portal. In: *Farreras. Medicina Interna* 14ª ed. McGraw-Hill Interamericana 2009;sección 2, parte II, capítulo 38.

16. Bowen DG, Zen M, Holz L, Davis T, McCaughan GW, Bertolino P. The site of primary T cell activation is a determinant of the balance between intrahepatic tolerance and immunity. *J Clin Invest* 2004;114:701–712.
17. Brennan M, Rees DJ. Sequence analysis of rat integrin alpha E1 and alpha E2 subunits: tissue expression reveals phenotypic similarities between intraepithelial lymphocytes and dendritic cells in lymph. *Eur J Immunol* 1997;27:3070-9.
18. Brieva A, García -Villarubia V, Guerrero A, Pivel JP, Giménez-Gallego G, Matji JA. Glicoconjugados de polipéptidos farmacológicamente activos. *Spanish patent* P9900408 and PCT/ES99/00338, 1999.
19. Brouck T, Gulbranson-Judge A, Flynn S, Riedinger M, Raykundalia C, Lane P. CD4 T cell traffic control: in vivo evidence that ligation of OX40 on CD4 T cells by OX40-ligand expressed on dendritic cells leads to the accumulation of CD4 T cells in B follicles. *Eur J Immunol*. 1999;29:1610-6.
20. Bruguera M, Rodés J. Cirrosis hepática compensada. In *Tratamiento de las enfermedades hepáticas y biliares*. Madrid: Elba 2001:99-104.
21. Cabre M, Camps J, Paternain JL, Ferré N, Joven J. Time-course of changes in hepatic lipid peroxidation and glutathione metabolism in rats with carbon tetrachloride-induced cirrhosis. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2000;27:694–699.
22. Campbell DJ, Butcher EC. Rapid acquisition of tissue-specific homing phenotypes by CD4(+) T cells activated in cutaneous or mucosal lymphoid tissues. *J Exp Med*. 2002;195:135–41.
23. Caramelo C, Fernandez-Munoz D, Santos JC, Blanchart A, Rodriguez-Puyol D, Lopez-Novoa JM, Hernando L. Effect of volume expansion on hemodynamics, capillary permeability and renal function in conscious, cirrhotic rats. *Hepatology*. 1986;6:129-34.
24. Carter PB, Collins FM. The route of enteric infection in normal mice. *J Exp Med*. 1974;139:1189-203.
25. Casafont F, Sanchez E, Martin L, Agüero J, Romero FP. Influence of malnutrition on the prevalence of bacterial translocation and spontaneous bacterial peritonitis in experimental cirrhosis in rats. *Hepatology*. 1997;25:1334-7.
26. Castell JV, Juan-Burgueño M. Anatomofisiología del hígado. In: *Gastroenterología y hepatología* 3ª ed. Elsevier science 2002;sección VII, capítulo 56.
27. Castilla A, Prieto J, Fausto N. Transforming growth factors beta 1 and alpha in chronic liver disease. Effects of interferon alfa therapy. *N Engl J Med*. 1991;324:933-40.
28. Caux C, Ait-Yahia S, Chemin K, de Bouteiller O, Dieu-Nosjean MC, Homey B, Massacrier C, Vanbervliet B, Zlotnik A, Vicari A. Dendritic cell biology and regulation of dendritic cell trafficking by chemokines. *Semin Immunopathol*. 2000;22:345-69.

29. Chan CC, Caspi R, Mochizuki M, Diamantstein T, Gery I, Nussenblatt RB. Cyclosporine and dexamethasone inhibit T-lymphocyte MHC class II antigens and IL-2 receptor expression in experimental autoimmune uveitis. *Immunol Invest*. 1987;16:319-31.
30. Chang ML, Yeh CT, Chang PY, Chen JC. Comparison of murine cirrhosis models induced by hepatotoxin administration and common bile duct ligation. *World J Gastroenterol* 2005;11:4167-4172.
31. Chaplin DD, Ala B. Overview of the human immune response. *J Allergy Clin Immunol*. 2006;117:S430-5.
32. Chow JC, Young DW, Golenbock DT, Christ WJ, Gusovsky F. Toll-like receptor-4 mediates lipopolysaccharide-induced signal transduction. *J Biol Chem* 1999;274: 10682–10692.
33. Chu CJ, Lee FY, Wang SS, Lu RH, Tsai YT, Lin HC, Hou MC, Chan CC, Lee SD. Hyperdynamic circulation of cirrhotic rats with ascites: role of endotoxin, tumour necrosis factor-alpha and nitric oxide. *Clin Sci (Lond)* 1997;93:219-25.
34. Cirera I, Bauer TM, Navasa M, Vila J, Grande L, Taura P, Fuster J, Garcia-Valdecasas JC, Lacy A, Suarez MJ, Rimola A, Rodes J. Bacterial translocation of enteric organisms in patients with cirrhosis. *J Hepatol* 2001;34:32-7
35. Clària J, Jiménez W. Experimental models of cirrhosis and ascites. In: *Ascites and renal dysfunction in liver disease*. Oxford: Blackwell Publishing, 2005:215-26.
36. Constandinou C, Henderson N, Iredale JP. Modeling liver fibrosis in rodents. *Methods Mol Med* 2005;117:237–250.
37. Cowdery JS, Chace JH, Yi AK, Krieg AM. Bacterial DNA induces NK cells to produce IFN-gamma in vivo and increases the toxicity of lipopolysaccharides. *J Immunol* 1996;156:4570–5
38. Crispe IN. Isolation of mouse intrahepatic lymphocytes. *Curr Protoc Immunol* 1997; Chapter 3:Unit 3.21:3.21.1-3.21.8.
39. D'Amico G, Garcia-Tsao G, Pagliaro L. Natural history and prognostic indicators of survival in cirrhosis. A systematic review of 118 studies. *J Hepatol* 2006;44:217-231.
40. De la Hera A, Albillos A, Reyes E, Nieto M, Muñoz L, Del Amo J, Escoll P, Revilla G, Ranz I, Mallo A, Sanz E, Alvarez Mon M. Novel immunotherapy strategies in cirrosis: Benefit of selective modulation of monocyte TNF α production by the oral immune response modifier AM3. *Immunology and the liver: Immunotherapy* 2004. Acción Médica S.A.; 265-269.
41. a. Delves PJ, Roitt IM. The immune system. First of two parts. *N Engl J Med* 2000;343:37-49.
42. b. Delves PJ, Roitt IM. The immune system. Second of two parts. *N Engl J Med* 2000;343:108-117.

43. Deviere J, Content J, Denys C, Vandenbussche P, Schandene L, Wybran J, Dupont E. Excessive in vitro bacterial lipopolysaccharide-induced production of monokines in cirrhosis. *Hepatology* 1990;11:628-34.
44. Doherty DG, O'Farrelly C. Innate and adaptative lymphoid cells in the human liver. *Immunol Rev.* 2000;174:5-20.
45. Domenicali M, Caraceni P, Giannone F, Baldassarre M, Lucchetti G, Quarta C, Patti C, Catani L, Nanni C, Lemoli RM, Bernardi M. A novel model of CCl₄-induced cirrhosis with ascites in the mouse. *J Hepatol* 2009;51:991-9.
46. Eigler A, Sinha B, Hartmann G, Endres S. Taming TNF: strategies to restrain this proinflammatory cytokine. *Immunol Today.* 1997;18:487-92.
47. El-Naggar MM, Khalil el-SA, El-Daker MA, Salama MF. Bacterial DNA and its consequences in patients with cirrhosis and culture-negative, non-neutrocytic ascites. *J Med Microbiol.* 2008;57:1533-8.
48. Fernández-Muñoz D, Caramelo C, Santos JC, Blanchart A, Hernando L, López-Novoa JM. Systemic and splanchnic hemodynamic disturbances in conscious rats with experimental liver cirrhosis without ascites. *Am J Physiol.* 1985;249:G316-20.
49. Francés R, Muñoz C, Zapater P, Uceda F, Gascón I, Pascual S, Pérez-Mateo M, Such J. Bacterial DNA activates cell mediated immune response and nitric oxide overproduction in peritoneal macrophages from patients with cirrhosis and ascites. *Gut.* 2004;53:860-4.
50. Francés R, Rodríguez E, Muñoz C, Zapater P, De la ML, Ndongo M, Pérez-Mateo M, Such J. Intracellular cytokine expression in peritoneal monocyte/macrophages obtained from patients with cirrhosis and presence of bacterial DNA. *Eur J Gastroenterol Hepatol.* 2005;17:45-51.
51. Francés R, González-Navajas JM, Zapater P, Muñoz C, Caño R, Pascual S, Santana F, Márquez D, Pérez-Mateo M, Such J. Translocation of bacterial DNA from Gram-positive microorganisms is associated with a species-specific inflammatory response in serum and ascitic fluid of patients with cirrhosis. *Clin Exp Immunol.* 2007;150:230-7.
52. García -Tsao G, Lee FY, Barden GE, Cartun R, West AB. Bacterial translocation to mesenteric lymph nodes is increased in cirrhotic rats with ascites. *Gastroenterology* 1995;108:1835-41.
53. Garcia-Tsao G, Friedman S, Iredale J, Pinzani M. Now there are many (stages) where before there was one: In search of a pathophysiological classification of cirrhosis. *Hepatology.* 2010;51:1445-9.
54. Geissmann F, Jung S, Littman DR. Blood monocytes consist of two principal subsets with distinct migratory properties. *Immunity* 2003;19:71-82.

55. Genescá J, Martí R, Rojo F, Campos F, Peribañez V, Gonzalez A, Castells L, Ruiz-Marcellan C, Margarit C, Esteban R, Guardia J, Segura R. Increased tumour necrosis factor alpha production in mesenteric lymph nodes of cirrhotic patients with ascites. *Gut* 2003;52:1054-9.
56. Ginés P, Arroyo V. Enfermedades del aparato digestivo: hepatología. Cirrosis hepática. In: *Farreras: Medicina Interna* 14ª ed. McGraw-Hill Interamericana 2009;sección 2, parte II, capítulo 44.
57. Girón JA, Alvarez-Mon M, Menéndez-Caro JL, Abreu L, Albillos A, Manzano L, Durantez A. Increased spontaneous and lymphokine-conditioned IgA and IgG synthesis by B cells from alcoholic cirrhotic patients. *Hepatology* 1992;16:664-70.
58. González-Navajas JM, Bellot P, Francés R, Zapater P, Muñoz C, García-Pagán JC, Pascual S, Pérez-Mateo M, Bosch J, Such J. Presence of bacterial-DNA in cirrhosis identifies a subgroup of patients with marked inflammatory response not related to endotoxin. *J Hepatol* 2008;48:61-7.
59. Guarner C, González-Navajas JM, Sánchez E, Soriano G, Francés R, Chiva M, Zapater P, Benlloch S, Muñoz C, Pascual S, Balanzó J, Pérez-Mateo M, Such J. The detection of bacterial DNA in blood of rats with CCl4-induced cirrhosis with ascites represents episodes of bacterial translocation. *Hepatology* 2006;44:633-639.
60. Hamann D, Baars PA, Rep MH, Hooibrink B, Kerkhof-Garde SR, Klein MR, van Lier RA. Phenotypic and functional separation of memory and effector human CD8+ T cells. *J Exp Med*. 1997;186:1407-18.
61. Hartley DP, Kolaja KL, Reichard J, Petersen DR. 4-hydroxynonenal and malondialdehyde hepatic protein adducts in rats treated with carbon tetrachloride: immunochemical detection and lobular localization. *Toxicol Appl Pharmacol* 1999;161:23-33.
62. Hemmi H, Takeuchi O, Kawai T, Kaisho T, Sato S, Sanjo H, Matsumoto M, Hoshino K, Wagner H, Takeda K, Akira S. A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. *Nature*. 2000;408:740-5.
63. Henson PM. Dampening inflammation. *Nat Immunol* 2005;6:1179-81.
64. Imuro Y, Gallucci RM, Luster MI, Kono H, Thurman RG. Antibodies to tumor necrosis factor alpha attenuate hepatic necrosis and inflammation caused by chronic exposure to ethanol in the rat. *Hepatology*. 1997;26:1530-7.
65. Iredale JP, Benyon RC, Pickering J, McCullen M, Northrop M, Pawley S, Hovell C, Arthur MJ. Mechanisms of spontaneous resolution of rat liver fibrosis. Hepatic stellate cell apoptosis and reduced hepatic expression of metalloproteinase inhibitors. *J Clin Invest* 1998;102:538-49.
66. Janeway CA, Travers P, Walport M, Shlomchik MJ. **Immunobiology. The Immune System in Health and Disease** 2004. Garland Publishing.
67. Jenkins MK, Khoruts A, Ingulli E, Mueller DL, McSorley SJ, Reinhardt RL, Itano A, Pape KA. In vivo activation of antigen-specific CD4 T cells. *Annu Rev Immunol*. 2001;19:23-45.

68. Jiménez W, Martínez-Pardo A, Arroyo V, Bruix J, Rimola A, Gaya J, Rivera F, Rodés J. Temporal relationship between hyperaldosteronism, sodium retention and ascites formation in rats with experimental cirrhosis. *Hepatology*. 1985;245-50.
69. Jiménez W, Clària J, Arroyo V, Rodés J. Carbon tetrachloride induced cirrhosis in rats: a useful tool for investigating the pathogenesis of ascites in chronic liver disease. *J Gastroenterol Hepatol*. 1992;7:90-7.
70. Kakumu S, Okumura A, Ishikawa T, Yano M, Enomoto A, Nishimura H, Yoshioka K, Yoshika Y. Serum levels of IL-10, IL-15 and soluble tumour necrosis factor-alpha (TNF-alpha) receptors in type C chronic liver disease. *Clin Exp Immunol*. 1997;109:458-63.
71. Kasper DL, Braunwald E, Fauci A, Hauser S, Longo D, Jameson JL. *Harrison's Principles of Internal Medicine* 16th Edition 2004. McGraw-Hill Professional.
72. Kerfoot SM, D'Mello C, Nguyen H, Ajuebor MN, Kubes P, Le T, Swain MG. TNF-alpha-secreting monocytes are recruited into the brain of cholestatic mice. *Hepatology* 2006;43:154-62
73. Kidd P. Th1/Th2 balance: the hypothesis, its limitations, and implications for health and disease. *Altern Med Rev*. 2003;8:223-46.
74. Kiyono H, McGhee JR, Wannemuehler MJ, Michalek SM. Lack of oral tolerance in C3H/HeJ mice. *J Exp Med* 1982;155(2):605-10.
75. Kita H, Mackay IR, Van De Water J, Gershwin ME. The lymphoid liver: considerations on pathways to autoimmune injury. *Gastroenterology* 2001;120:1485-501.
76. Knolle PA, Gerken G. Local control of the immune response in the liver. *Immunol Rev* 2000;174:21-34.
77. Krieg AM. CpG motifs in bacterial DNA and their immune effects. *Annu Rev Immunol* 2002;20:709-60.
78. Lanzavecchia A, Sallusto F. Understanding the generation and function of memory T cell subsets. *Curr Opin Immunol*. 2005;17:326-32.
79. Le Moine O, Marchant A, De Groote D, Azar C, Goldman M, Deviere J. Role of defective monocyte interleukin-10 release in tumor necrosis factor-alpha overproduction in alcoholics cirrhosis. *Hepatology* 1995;22:1436-9.
80. Llovet JM, Bartoli R, Planas R, Cabre E, Jimenez M, Urban A, Ojanguren I, Arnal J, Gassull MA. Bacterial translocation in cirrhotic rats. Its role in the development of spontaneous bacterial peritonitis. *Gut*. 1994;35:1648-52.
81. Llovet JM, Bartoli R, March F, Planas R, Vinado B, Cabre E, Arnal J, Coll P, Ausina V, Gassull MA. Translocated intestinal bacteria cause spontaneous bacterial peritonitis in cirrhotic rats: molecular epidemiologic evidence. *J Hepatol* 1998;28:307-13.

82. López-Talavera JC, Merrill WW, Groszmann RJ. Tumor necrosis factor alpha: a major contributor to the hyperdynamic circulation in prehepatic portal-hypertensive rats. *Gastroenterology* 1995;108:761-7
83. López-Talavera JC, Cadelina G, Olchowski J, Merrill W, Groszmann RJ. Thalidomide inhibits tumor necrosis factor alpha, decreases nitric oxide synthesis, and ameliorates the hyperdynamic circulatory syndrome in portal-hypertensive rats. *Hepatology* 1996;23:1616-21.
84. López-Talavera JC, Levitzki A, Martínez M, Gazit A, Esteban R, Guardia J. Tyrosine kinase inhibition ameliorates the hyperdynamic state and decreases nitric oxide production in cirrhotic rats with portal hypertension and ascites. *J Clin Invest* 1997;100:664-70.
85. MacKay CR, Marston W, Dudler L. Altered patterns of T cell migration through lymph nodes and skin following antigen challenge. *Eur J Immunol.* 1992;22:2205-10.
86. Manibusan MK, Odin M, Eastmond DA. Postulated carbon tetrachloride mode of action: a review. *J Environ Sci Health C Environ Carcinog Ecotoxicol Rev* 2007;25(3):185-209.
87. Medzhitov R, Janeway C. Innate immunity. *N Engl J Med* 2000; 343:338-344.
88. Muñoz J, Albillos A, Pérez-Páramo M, Rossi I, Alvarez-Mon M. Factors mediating the hemodynamic effects of tumor necrosis factor-alpha in portal hypertensive rats. *Am J Physiol* 1999;276:G687-93.
89. Muñoz L, Albillos A, Nieto M, Reyes E, Lledó L, Monserrat J, Sanz E, de la Hera A, Alvarez-Mon M. Mesenteric Th1 polarization and monocyte TNF-alpha production: first steps to systemic inflammation in rats with cirrhosis. *Hepatology* 2005;42:411-419.
90. Nössal GJ. Current concepts: immunology. The basic components of the immune system. *N Engl J Med.* 1987;316(21):1320-5
91. Oben JA, Roskams T, Yang S, Lin H, Sinelli N, Torbenson M, Smedh U, Moran TH, Li Z, Huang J, Thomas SA, Diehl AM. Hepatic fibrogenesis requires sympathetic neurotransmitters. *Gut.* 2004;53:438-445.
92. Oo YH, Adams DH. The role of chemokines in the recruitment of lymphocytes to the liver. *J Autoimmun.* 2010;34(1):45-54.
93. Ortaldo JR, Herberman RB. Heterogeneity of Natural Killer cells. *Annu Rev Immunol* 1984;2:359-94
94. Parker G, Picut C. Liver Immunobiology. *Toxicologic Pathology* 2005;33:52-62.
95. Parkin J, Cohen B. An overview of the immune system. *Lancet* 2001;357:1777-89.
96. Paterson DJ, Jefferies WA, Green JR, Brandon MR, Corthesy P, Puklavec M, Williams AF. Antigens of activated rat T lymphocytes including a molecule of 50,000 Mr detected only on CD4 positive T blasts. *Mol Immunol* 1987;24:1281-90.

97. Pérez-Páramo M, Muñoz J, Albillos A, Freile I, Portero F, Santos M, Ortiz-Berrocal J. Effect of propranolol on the factors promoting bacterial translocation in cirrhotic rats with ascites. *Hepatology* 2000;31:43-8.
98. Popper H. Pathologic aspects of cirrhosis. A review. *Am J Pathol.* 1977;87:228-64.
99. Proctor E, Chatamra K. High yield micronodular cirrhosis in the rat. *Gastroenterology.* 1982;83:1183-90.
100. Ramírez F, Mason D. Recirculatory and sessile CD4+ T lymphocytes differ on CD45RC expression. *J Immunol.* 2000;165:1816-23.
101. Rappaport AM, MacPhee PJ, Fisher MM, Phillips MJ. The scarring of the liver acini (Cirrhosis). Tridimensional and microcirculatory considerations. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol.* 1983;402:107-37.
102. Reichen J, Egger B, Ohara N, Zeltner TB, Zysset T, Zimmermann A. Determinants of hepatic function in liver cirrhosis in the rat. Multivariate analysis. *J Clin Invest.* 1988;82:2069-76.
103. Reyes E, Alonso-Lebrero JL, Brieva A, Mallo AB, Valdes-Hevia MD, Pivel JP, Alvarez-Mon M. Alternative (Non-animal) Method For TNF α Production Test. *6th World Congress on Trauma, Shock, Inflammation and Sepsis.* March 2-6, 2004. Munich, Germany.
104. Roos A, Schilder-Tol EJ, Weening JJ, Aten J. Strong expression of CD134 (OX40), a member of the TNF receptor family, in a T helper 2-type cytokine environment. *J Leukoc Biol* 1998;64:503-10.
105. Ros E. Enfermedades del aparato digestivo: hepatología. Enfermedades de las vías biliares. In: *Farreras: Medicina Interna* 14^a ed. McGraw-Hill Interamericana 2009;sección 2, parte II, capítulo 54.
106. Rufer N, Zippelius A, Batard P, Pittet MJ, Kurth I, Corthesy P, Cerottini JC, Leyvraz S, Roosnek E, Nabholz M, Romero P. Ex vivo characterization of human CD8+ T subsets with distinct replicative history and partial effector functions. *Blood* 2003;102(5):1779–87.
107. Runyon BA, Sugano S, Kanel G, Mellencamp MA. A rodent model of cirrhosis, ascites, and bacterial peritonitis. *Gastroenterology.* 1991;100:489-93.
108. Runyon BA, Squier S, Borzio M. Translocation of gut bacteria in rats with cirrhosis to mesenteric lymph nodes partially explains the pathogenesis of spontaneous bacterial peritonitis. *J Hepatol.* 1994;21:792-6.
109. Runyon BA, Borzio M, Young S, Squier SU, Guarner C, Runyon MA. Effect of selective bowel decontamination with norfloxacin on spontaneous bacterial peritonitis, translocation, and survival in an animal model of cirrhosis. *Hepatology* 1995;21:1719-24.
110. Sallusto F, Lenig D, Förster R, Lipp M, Lanzavecchia A. Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions. *Nature.* 1999;401(6754):708-12.

- 111.a. Sallusto F, Lanzavecchia A. Understanding dendritic cell and T-lymphocyte traffic through the analysis of chemokine receptor expression. *Immunol Rev*. 2000;177:134-40.
- 112.b. Sallusto F, Mackay R, Lanzavecchia A. The role of chemokine receptors in primary, effector, and memory immune responses. *Annu Rev Immunol*. 2000;18:593-620.
113. Sallusto F, Geginat J, Lanzavecchia A. Central memory and effector memory T cell subsets: function, generation, and maintenance. *Annu. Rev. Immunol*. 2004;22:745-63
114. Schwabe R., Bataller R, Brenner DA. Human hepatic stellate cells express CCR5 and RANTES to induce proliferation and migration. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol*. 2003;285:G949-G958.
115. Scriba A, Grau V, Steiniger B. Phenotype of rat monocytes during acute kidney allograft rejection: increased expression of NKR-P1 and reduction of CD43. *Scand J Immunol* 1998;47:332-42.
116. Seder RA, Ahmed R. Similarities and differences in CD4+ and CD8+ effector and memory T cell generation. *Nat Immunol*. 2003;4(9):835-42.
117. Seki E, De Minicis S, Osterreicher CH, Kluwe J, Osawa Y, Brenner DA, Schwabe RF. TLR4 enhances TGF- β signaling and hepatic fibrosis. *Nat Med*. 2007;13(11):1324-32.
118. Shi Z., Wakil AE., Rockey DC. Strainspecific differences in mouse hepatic wound healing are mediated by divergent T helper cytokine responses. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1997;94:10663-10668.
119. Shirachi M, Sata M, Miyajima I, Tanaka M, Tanikawa K. Liver-associated natural killer activity in cirrhotic rats. *Microbiol Immunol* 1998 42(2):117-124.
120. Simmons D, Seed B. The Fc gamma receptor of natural killer cells is a phospholipid-linked membrane protein. *Nature*. 1988;333:568-70.
121. Sobrevals L, Rodriguez C, Romero-Trevejo JL, Gondi G, Monreal I, Pañeda A, Juanarena N, Arcelus S, Razquin N, Guembe L, González-Aseguinolaza G, Prieto J, Fortes P. Insulin-Like Growth Factor I gene transfer to cirrhotic liver induces fibrolysis and reduces fibrogenesis leading to cirrhosis reversion in rats. *Hepatology* 2010;51:912-921.
122. Spickett GP, Brandon MR, Mason DW, Williams AF, Woollett GR. MRC OX-22, a monoclonal antibody that labels a new subset of T lymphocytes and reacts with the high molecular weight form of the leukocyte-common antigen. *J Exp Med* 1983;158(3):795-810.
123. Steiniger B, Stehling O, Scriba A, Grau V. Monocytes in the rat: Phenotype and function during acute allograft rejection. *Immunol Rev* 2001;184:38-44.
124. Subra JF, Cautain B, Xystrakis E, Mas M, Lagrange D, van der Heijden H, van de Gaar MJ, Druet P, Fournie GJ, Saoudi A, Damoiseaux J. The balance between CD45RChigh and CD45RClow CD4 T cells in rats is intrinsic to bone marrow-derived cells and is genetically controlled. *J Immunol*. 2001;166:2944-52.

125. Such J, Francés R, Muñoz C, Zapater P, Casellas JA, Cifuentes A, Rodríguez-Valera F, Pascual S, Sola-Vera J, Carnicer F, Uceda F, Palazón JM, Pérez-Mateo M. Detection and identification of bacterial DNA in patients with cirrhosis and culture-negative, nonneutrocytic ascites. *Hepatology*. 2002;36:135-41
126. Sweet MJ, Stacey KJ, Kakuda DK, Markovich D, Hume DA. IFN-gamma primes macrophage responses to bacterial DNA. *J Interferon Cytokine Res* 1998;18:263-71.
127. Tamatani T, Kotani M, Miyasaka M. Characterization of the rat leukocyte integrin, CD11/CD18, by the use of LFA-1 subunit-specific monoclonal antibodies. *Eur J Immunol* 1991;21:627-33.
128. Tamayo RP. Is cirrhosis of the liver experimentally produced by CCl₄ an adequate model of human cirrhosis? *Hepatology* 1983;3:112-120.
129. Teixeira-Clerc F, Julien B, Grenard P, Tran Van Nhieu J, Deveaux V, Li L, Serriere-Lanneau V, Ledent C, Mallat A, Lotersztajn S. CB1 cannabinoid receptor antagonism: a new strategy for the treatment of liver fibrosis. *Nat Med* 2006;12:671-6.
- 130.a. Terés J, Mas A. Enfermedades del aparato digestivo: hepatología. Insuficiencia hepática aguda grave y encefalopatía hepática. In: *Farreras: Medicina Interna* 14^a ed. McGraw-Hill Interamericana 2009;sección 2, parte II, capítulo 40.
- 131.b. Terés J, Sánchez-Tapias JM, Bordas JM, Bru C, Montaña X. Enfermedades del aparato digestivo: hepatología. Generalidades. In: *Farreras: Medicina Interna* 14^a ed. McGraw-Hill Interamericana 2009;sección 2, parte II, capítulo 36.
132. Tilg H, Wilmer A, Vogel W, Herold M, Nolchen B, Judmaier G, Huber C. Serum levels of cytokines in chronic liver diseases. *Gastroenterology* 1992;103:264-74.
133. Tilg H, Vogel W, Wiedermann CJ, Shapiro L, Herold M, Judmaier G, Dinarello CA. Circulating interleukin-1 and tumor necrosis factor antagonists in liver disease. *Hepatology* 1993;18:1132-8.
134. Tilney NL. Patterns of lymphatic drainage in the adult laboratory rat. *J Anat* 1971;109:369-383.
135. Tsukamoto H, Matsuoka M, French SW. Experimental models of hepatic fibrosis: a review. *Semin Liver Dis* 1990;10:56-65.
136. Uhrig A, Banafsche R, Kremer M, Hegenbarth S, Hamann A, Neurath M, Gerken G, Limmer A, Knolle PA. Development and functional consequences of LPS tolerance in sinusoidal endothelial cells of the liver. *J Leukoc Biol* 2005;77:626-33.
137. Von Andrian UH, Mackay CR. T-cell function and migration. Two sides of the same coin. *N Engl J Med* 2000;343:1020-34
138. Von Baehr V, Docke WD, Plauth M, Liebenenthal C, Kupferling S, Lochs H, Baumgarten R, Volk HD. Mechanisms of endotoxin tolerance in patients with alcoholic liver cirrhosis: role of interleukin 10, interleukin 1 receptor antagonist, and soluble tumour necrosis factor receptors as well as effector cell desensitisation. *Gut* 2000;47:281-7.

- 139.Vorobioff J, Bredfeldt JE, Groszmann RJ. Hyperdynamic circulation in portal-hypertensive rat model: a primary factor for maintenance of chronic portal hypertension. *Am J Physiol* 1983;244:G52-7.
- 140.Vorobioff J, Bredfeldt JE, Groszmann RJ. Increased blood flow through the portal system in cirrhotic rats. *Gastroenterology* 1984;87:1120-6.
- 141.Wagner H. Interactions between bacterial CpG-DNA and TLR9 bridge innate and adaptive immunity. *Curr Opin Microbiol* 2002;5:62–9.
- 142.Watanabe A, Hashmi A, Gomes DA, Town T, Badou A, Flavell RA, Mehal WZ. Apoptotic hepatocyte DNA inhibits hepatic stellate cell chemotaxis via toll-like receptor 9. *Hepatology*. 2007;46(5):1509-18.
- 143.Weinberg AD, Wallin JJ, Jones RE, Sullivan TJ, Bourdette DN, Vandenbark AA, Offner H. Target organ-specific up-regulation of the MRC OX-40 marker and selective production of Th1 lymphokine mRNA by encephalitogenic T helper cells isolated from the spinal cord of rats with experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol*. 1994;152:4712-21
- 144.a. Wiest R, Das S, Cadelina G, Garcia-Tsao G, Milstien S, Groszmann RJ. Bacterial translocation in cirrhotic rats stimulates eNOS-derived NO production and impairs mesenteric vascular contractility. *J Clin Invest* 1999;104:1223-33.
- 145.b. Wiest R, Shah V, Sessa WC, Groszmann RJ. NO overproduction by eNOS precedes hyperdynamic splanchnic circulation in portal hypertensive rats. *Am J Physiol* 1999;276:G1043-51.
- 146.Williams AT, Burk RF. Carbon tetrachloride hepatotoxicity: an example of free radical-mediated injury. *Semin Liver Dis*. 1990;10:279-84.
- 147.Wong FW, Chan WY, Lee SS. Resistance to carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity in mice which lack CYP2E1 expression. *Toxicol Appl Pharmacol*. 1998;153:109-18.
- 148.Woollett GR, Barclay AN, Puklavec M, Williams AF. Molecular and antigenic heterogeneity of the rat leukocyte-common antigen from thymocytes and T and B lymphocytes. *Eur J Immunol* 1985;15:168-73.
- 149.Yokoyama WM, Seaman WE. The Ly-49 and NKR-P1 gene families encoding lectin-like receptors on natural killer cells: the NK gene complex. *Annu Rev Immunol* 1993;11:613-35.
- 150.Young AJ. The physiology of lymphocyte migration through the single lymph node in vivo. *Semin Immunol*. 1999;11:73-83.
- 151.Yrlid U, Jenkins CD, MacPherson GG. Relationships between distinct blood monocyte subsets and migrating intestinal lymph dendritic cells in vivo under steady-state conditions. *J Immunol* 2006;176:4155-4162.

152. Zapater P, Francés R, González-Navajas JM, de la Hoz MA, Moreu R, Pascual S, Monfort D, Montoliu S, Vila C, Escudero A, Torras X, Cirera I, Llanos L, Guarner-Argente C, Palazón JM, Carnicer F, Bellot P, Guarner C, Planas R, Solá R, Serra MA, Muñoz C, Pérez-Mateo M, Such J. Serum and ascitic fluid bacterial DNA: a new independent prognostic factor in noninfected patients with cirrhosis. *Hepatology*. 2008;48(6):1924-31.

ANEXO I: Financiación

La presente Tesis Doctoral se ha financiado en parte con las ayudas y becas siguientes:

- María P. Ubeda ha sido financiada por una beca del Ministerio de Educación (BES-2004-5534), y en la actualidad está contratada por el Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Hepáticas y Digestivas (CiberEHD).
- Agustín Albillos ha recibido subvenciones para Proyectos de Investigación del Ministerio de Educación (no. BFU 2006-09280/BFI), del Ministerio de Ciencia e Innovación, Instituto de Salud Carlos III (no. EC08/00122 y PS09/00485) y de la Fundación Mutua Madrileña.
- Melchor Álvarez de Mon ha recibido subvenciones para Proyectos de Investigación de la Comunidad de Madrid (MITIC-CM S-BIO-0189/2006).
- Agustín Albillos y Melchor Álvarez de Mon pertenecen al Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Hepáticas y Digestivas (CiberEHD), que es financiado por el Instituto de Salud Carlos III.

ANEXO II: Publicaciones

Sistema inmunitario inflamatorio en la cirrosis. Relevancia de la translocación bacteriana

A. Albillos Martínez^{a,b}, L. Muñoz Zamarrón^b, M. Nieto^b, M. Úbeda Cantero^b, A. de la Hera Martínez^b
y M. Álvarez-Mon Soto^b

^aServicio de Gastroenterología. Hospital Ramón y Cajal. Universidad de Alcalá. Madrid.

^bLaboratorio de Enfermedades del Sistema Inmune. Departamento de Medicina. Unidad I+D asociada al Centro Nacional de Biotecnología (CSIC). Universidad de Alcalá. Madrid. España.

INTRODUCCIÓN

Clásicamente se ha considerado que la participación del sistema inmunitario en la cirrosis se restringía a 2 aspectos: la etiopatogenia de la necrosis hepatocitaria y la hiper gammaglobulinemia y la elevada predisposición a infecciones bacterianas que presentan algunos de estos pacientes. Por ello, los estudios realizados se centraron en analizar las bases celulares de la alteración del sistema inmunitario en esta enfermedad. Se observó que las células T presentaban diferentes patrones de secreción de citocinas que favorecían la diferenciación de los linfocitos B a células plasmáticas productoras de distintos isotipos de inmunoglobulinas en función de la etiología de la cirrosis¹. Otros grupos encontraron una reducida capacidad fagocítica en los monocitos de los pacientes más susceptibles a las infecciones, una sensibilidad aumentada de estos monocitos al estímulo con componentes de la pared bacteriana y alteraciones en la actividad citotóxica de las células *natural killer* (NK) de estos pacientes. También se realizaron diversos estudios encaminados a analizar descriptivamente parámetros inmunológicos tales como la distribución de subpoblaciones linfocitarias, la activación leucocitaria y la expresión de moléculas de adhesión detectada en la sangre periférica o los valores séricos de mediadores solubles.

En los últimos años, este concepto de cirrosis se ha modificado y ampliado, y se ha pasado a considerar que las alteraciones del sistema inmunitario observadas en los pacientes con cirrosis no son sólo una consecuencia del daño hepático, sino que también participan en la etiopatogenia, la progresión y las manifestaciones clínicas de la enfermedad. En este sentido se ha demostrado que, inclu-

so cuando ya se encuentra establecida, la cirrosis es un proceso dinámico en el que el sistema inmunitario se encuentra sometido a una estimulación anormal que pudiera favorecer su participación en la elevada predisposición a infecciones bacterianas, en las alteraciones hemodinámicas o en la respuesta inflamatoria del hígado y de otros órganos.

Desde un punto de vista teórico, varios son los mecanismos etiopatogénicos potencialmente implicados en la alteración del sistema inmunitario en la cirrosis. Entre ellos: *a*) la intolerancia a antígenos propios, esto es, una respuesta autoinmunitaria; *b*) la modificación de los propios antígenos hepáticos por virus hepatotropos o tóxicos; o *c*) por las alteraciones del medio interno debidas a anomalías metabólicas y neuroendocrinas propias de la insuficiencia hepática y, por último, *d*) agentes o productos bacterianos que hayan accedido al organismo del paciente cirrótico. En la cirrosis existe una tasa elevada de translocación bacteriana a los ganglios linfáticos mesentéricos y un aumento de la permeabilidad intestinal^{2,3}, por lo que nos centramos en el potencial impacto del acceso de los gérmenes entéricos al organismo y de su interacción con el sistema inmunitario del paciente con cirrosis.

TRANSLOCACIÓN BACTERIANA EN LA CIRROSIS

La cirrosis avanzada, experimental y humana, se caracteriza por una alta tasa de translocación bacteriana a los ganglios linfáticos mesentéricos secundaria a daño en la barrera intestinal²⁻⁴. Se ha constatado en cirrosis experimental y humana el sobrecrecimiento de los microorganismos de la luz intestinal, una elevada permeabilidad de la barrera intestinal y un sistema inmunitario alterado en el territorio esplácnico.

Tanto los pacientes como los modelos experimentales de cirrosis presentan alteraciones en la función motriz coordinada del intestino delgado, probablemente por una elevada actividad adrenérgica, lo que genera un retraso en el

Correspondencia: Dr. A. Albillos Martínez.
Servicio de Gastroenterología. Hospital Ramón y Cajal.
Ctra. de Colmenar, km 9,100. 28034 Madrid. España.
Correo electrónico: aalbillosm@meditex.es

tránsito intestinal y favorece el sobrecrecimiento de las enterobacterias en la luz del intestino². Se ha propuesto que el estrés oxidativo en la pared intestinal, la elevada actividad del sistema nervioso simpático y la elevada producción de óxido nítrico son algunos de los factores que podrían favorecer la dismotilidad intestinal en la cirrosis. La cirrosis también se asocia con alteraciones estructurales y funcionales de la mucosa intestinal que podrían incrementar la permeabilidad del intestino. No existen evidencias experimentales claras que confirmen si la congestión de la mucosa, la inflamación de la submucosa o el edema que se producen en la pared intestinal en la cirrosis son la causa o el resultado de la translocación bacteriana. Estudios en modelos experimentales de cirrosis han determinado que se produce un estrés oxidativo en la mucosa del intestino delgado caracterizado por una elevada actividad xantina oxidasa y un estado antioxidante alterado, una incrementada peroxidación lipídica del borde en cepillo y un transporte intestinal anormal⁵, que son cambios similares a los observados en otros modelos experimentales con elevadas frecuencias de translocación bacteriana.

El concurso de estos 2 mecanismos, sobrecrecimiento bacteriano y aumento de la permeabilidad intestinal, en un individuo inmunocompetente no es suficiente para el establecimiento de la translocación bacteriana, dado que el sistema inmunitario es capaz de captar las bacterias y transportarlas al ganglio linfático mesentérico de drenaje, donde se activa una respuesta inmunitaria local que aclara los microorganismos y evita su proliferación y su posterior entrada en la circulación. Sin embargo, la reducida capacidad bacteriostática y opsonica en el suero, así como el defecto en la capacidad fagocítica de los neutrófilos y en la efectora de otras células inmunocompetentes que presentan tanto los pacientes como los modelos experimentales de cirrosis, podría favorecer la llegada de estas bacterias al ganglio linfático mesentérico y su paso a la circulación. Estudios en modelos experimentales han demostrado reducidas cantidades de las proteínas del complemento en el suero de ratas cirróticas con ascitis, lo que deterioraría la capacidad fagocítica y opsonica del sistema inmunitario. Esto también se ha detectado en pacientes cirróticos, en los que, además, se correlacionaba con una reducida capacidad de síntesis de proteínas del hígado. Asimismo, la hiperemia esplácica que acompaña a la hipertensión portal en la cirrosis altera el rodamiento, la adherencia y la migración de las células fagocíticas, lo que dificulta aún más el aclaramiento de las bacterias.

FUNDAMENTOS DE LA RESPUESTA INMUNITARIA CONTRA LOS PATÓGENOS

Hay numerosos indicios de que los productos bacterianos entéricos podrían promover la activación del sistema inmunitario en la cirrosis. En este sentido se ha demostrado la relación entre la activación del sistema inmunitario y la translocación de bacterias a los ganglios linfáticos mesentéricos, la reducción de este estado de activación tras la descontaminación intestinal con antibióticos y su asocia-

ción con un elevado riesgo de infecciones bacterianas espontáneas en los pacientes con elevada concentración plasmática de proteína de unión al lipopolisacárido (*lipopolysaccharide binding protein*, LBP)⁶⁻¹⁰.

Una vez que las bacterias atraviesan la pared intestinal, son detectadas por las células de la estirpe monocito-dendrítica localizadas en la lámina propia de la mucosa del intestino, que se activan y fagocitan los microorganismos¹¹. Pero no sólo las bacterias son capaces de provocar la activación de las células fagocíticas, también los productos bacterianos son capaces de generar una respuesta innata local¹². Esta activación de la respuesta innata depende del reconocimiento específico de moléculas altamente conservadas en la superficie de los patógenos, denominadas «patrones moleculares asociados a patógenos» (*pathogen-associated molecular patterns*, PAMP), entre los que se encuentra, por ejemplo, el lipopolisacárido (LPS, endotoxina) bacteriano, que la mayor parte de las células mononucleares reconocen por medio de receptores de reconocimiento de patrón policlonales¹³. De éstos, existe una familia de 11 receptores identificados recientemente que reciben el nombre de receptores de tipo Toll (*Toll like receptors*, TLR), de los cuales los TLR 2, 4 y 9 son los más relevantes. El LPS, componente de la pared celular de bacterias gramnegativas transportado en plasma por el LBP, se une al receptor CD14 que expresan los monocitos, lo que, a su vez, facilita la posterior interacción de ambas moléculas con el TLR 4 en la superficie de estas células. La señalización por esta vía induce en los monocitos la activación del factor de transcripción NF- κ B, lo que desemboca en la liberación de citocinas proinflamatorias, como el factor de necrosis tumoral (TNF) α , la interleucina (IL) 1 β y la IL-6, y de quimiocinas, la liberación del dominio extracelular del receptor CD14 y la expresión de moléculas coestimuladoras como el CD80 y el CD86 y de moléculas de MHC I y II.

Tras la activación y fagocitosis de las bacterias por las células de la estirpe monocito-dendrítica, éstas migran al ganglio linfático mesentérico local, donde presentan los péptidos proteínicos de las enterobacterias ya procesados a las células T vírgenes, que se encuentran continuamente recirculando por los órganos linfoides secundarios. Si las células T cooperadoras reconocen su antígeno específico, se activan. También las células B dejan de recircular por los ganglios linfáticos cuando encuentran su antígeno específico, y quedan allí retenidas. La interacción con las células T cooperadoras activadas favorece la activación de las células B, y se establece así lo que se conoce como un foco primario de expansión clonal, en el que ambos tipos de linfocitos proliferan. Parte de las células T cooperadoras activadas quedan retenidas en el ganglio linfático mesentérico, mientras que otras salen a la circulación para desde allí, guiadas por quimiocinas y moléculas de adhesión recién expresadas, alcanzar el tejido periférico inflamado de donde procedía el antígeno que las activó¹⁴.

Una de las citocinas liberadas como consecuencia de la presentación antigénica en el ganglio linfático mesentérico es el TNF α . El TNF α posee una función reguladora en la superficie de las células accesorias, los linfocitos T, B

y NK, y las células polimorfonucleares. Esta citocina, además, es capaz de producir estrés y daño en las células parenquimatosas que causan la generación de reactantes inflamatorios. El TNF α también ejerce una acción morfogénica en los ganglios linfáticos, que favorece la cooperación entre células accesorias, macrófagos y linfocitos. Por lo tanto, la liberación local de esta citocina participa en la defensa del tejido infectado. Sin embargo, si las bacterias consiguen burlar los sistemas de defensa y alcanzan la sangre, los mismos mecanismos por los que el TNF α contiene la infección local de forma tan eficaz pueden ser letales a nivel sistémico. La sepsis se acompaña de la liberación masiva de TNF α y de otras citocinas proinflamatorias en el bazo, el hígado y otras localizaciones, lo que ocasiona la vasodilatación y la pérdida de volumen plasmático por aumento de la permeabilidad vascular que conducen, en última instancia, al shock.

CONTRIBUCIÓN DE LAS BACTERIAS ENTÉRICAS A LAS ALTERACIONES DE LOS MEDIADORES SOLUBLES DEL SISTEMA INMUNITARIO EN LA CIRROSIS

En la cirrosis, principalmente en sus fases más avanzadas, se ha objetivado un aumento de citocinas proinflamatorias, en particular TNF α ^{6-8,10,15-17}. Las ratas cirróticas con traslocación bacteriana muestran mayor concentración sérica de esta citocina que aquellas sin traslocación⁶. Asimismo, los pacientes cirróticos con más TNF α en los ganglios mesentéricos son los que también presentan mayor concentración circulante de esta citocina⁸. Estas relaciones indican que la producción mesentérica de TNF α contribuye a incrementar su cantidad circulante en la cirrosis y señalan la relevancia patogénica que en este aumento desempeñan las bacterias entéricas.

Los pacientes cirróticos en los que el paso a la circulación de LPS y de productos bacterianos es más frecuente son los que presentan concentraciones séricas más elevadas de TNF α , IL-6 y otras citocinas proinflamatorias y las anomalías hemodinámicas más acentuadas. Estos pacientes se identifican por un aumento de LBP circulante o por la presencia en sangre de ADN bacteriano^{7,17-19}. De hecho, los pacientes cirróticos con ascitis en los que se encuentra aumentada la concentración sérica de LBP presentan más citocinas proinflamatorias circulantes⁷. La descontaminación intestinal con norfloxacin en pacientes cirróticos normaliza la concentración sérica de LBP y reduce la circulación de citocinas, lo que sustenta la importancia de las bacterias entéricas en la patogenia de estas alteraciones⁷. Otros mediadores solubles que se encuentran elevados en la cirrosis, incluso en ausencia de infección bacteriana clínicamente evidente, son la IL-1 β , la IL-8, el interferón (IFN) γ , la IL-12 y la IL-18, receptores solubles como el sTNFR1 y el sTNFR2, el receptor de la IL-1 β y el de la IL-6 y citocinas antiinflamatorias como la IL-10^{7,15,16}. Diversas evidencias clínicas y experimentales señalan que las elevadas concentraciones de estos mediadores solubles pueden contribuir al mantenimiento o incluso al progreso de la enfermedad, y con ello al desarrollo de sus

manifestaciones más características, como el síndrome de circulación hiperdinámica y la ascitis.

Es importante reseñar que los pacientes y los modelos experimentales de cirrosis con un estado proinflamatorio sistémico más acentuado son los que muestran un mayor deterioro hemodinámico^{6,7}. El nexo entre ambas alteraciones probablemente sea la capacidad del TNF α y de otras citocinas proinflamatorias de estimular la síntesis endotelial de óxido nítrico, lo que contribuye a agravar la vasodilatación sistémica y el estado circulatorio hiperdinámico en la cirrosis. A su vez, demuestra la relación de las bacterias entéricas con estas alteraciones el hecho de que la administración de norfloxacin reduce la translocación de bacterias gramnegativas a ganglios linfáticos mesentéricos, la concentración sérica de TNF α y la actividad de la óxido nítrico sintetasa endotelial e inducible de la aorta en ratas cirróticas²⁰, y disminuye la concentración sérica de nitratos y nitritos y atenúa el estado circulatorio hiperdinámico en pacientes con cirrosis^{7,21}.

CONTRIBUCIÓN DE LAS BACTERIAS ENTÉRICAS A LAS ALTERACIONES DE LOS ELEMENTOS CELULARES DEL SISTEMA INMUNITARIO EN LA CIRROSIS

Una profunda alteración en la distribución y el estado de activación de las células inmunitarias subyace en el aumento de mediadores solubles del sistema inmunitario inflamatorio observado en pacientes y en modelos experimentales de cirrosis^{10,17}. Dicha alteración se caracteriza por la polarización Th1 de las células T circulantes a la producción de IFN γ , y la activación de los monocitos a la secreción de TNF α . La población de monocitos circulantes se encuentra significativamente expandida y exhibe una mayor expresión de moléculas de MHC de clase II, así como de moléculas de membrana implicadas en la activación de los linfocitos T y en la regulación del tráfico sanguíneo y de la distribución celular. El compartimento de células T circulantes se encuentra retraído. En el caso de las células Th, esta disminución ocurre principalmente a expensas de las células vírgenes y en el de las células T citotóxicas, a expensas tanto de las células vírgenes como de las activadas/memoria^{10,17}.

Este estado de activación del sistema inmunitario inflamatorio a nivel sistémico se inicia en el territorio esplácnico como consecuencia de la interacción de las células inmunitarias del ganglio linfático mesentérico con las bacterias o productos bacterianos de origen entérico que se translocan¹⁰. Ello produce una respuesta de los brazos innato y adquirido del sistema inmunitario entérico, tal y como lo demuestra la intensa expansión y activación de las células T y B y los monocitos. Posteriormente, la recirculación de estas células inmunitarias activadas extiende la inflamación a la circulación sistémica. Esta afirmación se sustenta en la ausencia de signos de activación de las células del sistema inmunitario en los ganglios linfáticos periféricos, como los axilares, carentes de relación de drenaje con el lecho esplácnico; en los perfiles inmunofenotípicos de las células T de los ganglios linfáticos me-

sentéricos y de sangre periférica, y en la mayor intensidad de la activación de las células inmunitarias en el ganglio mesentérico que en la circulación periférica. La descontaminación intestinal con antibióticos atenúa estas alteraciones en la distribución y el estado de activación de las células del sistema inmunitario mesentérico y sistémico, lo que indica la relevancia del estímulo bacteriano de origen entérico en su patogenia^{10,17}.

BIBLIOGRAFÍA

1. Girón JA, Álvarez-Mon M, Menéndez-Caro JL, et al. Increased spontaneous and lymphokine-conditioned IgA and IgG synthesis by B cells from alcoholic cirrhotic patients. *Hepatology*. 1992;16:664-70.
2. Pérez-Paramo M, Muñoz J, Albillos A, et al. Effect of propranolol on the factors promoting bacterial translocation in cirrhotic rats with ascites. *Hepatology*. 2000;31:43-8.
3. Albillos A, De la Hera A. Multifactorial gut barrier failure in cirrhosis: working out the role of probiotics and antioxidants. *J Hepatol*. 2002;37:523-6.
4. Cirera I, Bauer TM, Navasa M, et al. Bacterial translocation of enteric organisms in patients with cirrhosis. *J Hepatol*. 2001;34:32-7.
5. Chiva M, Guarner C, Peralta C, et al. Intestinal mucosal oxidative damage and bacterial translocation in cirrhotic rats. *Eur J Gastroenterol Hepatol*. 2003;15:145-50.
6. Wiest R, Das S, Cadelina G, et al. Bacterial translocation in cirrhotic rats stimulates eNOS-derived NO production and impairs mesenteric vascular contractility. *J Clin Invest*. 1999;104:1223-33.
7. Albillos A, De la Hera A, González M, et al. Increased lipopolysaccharide binding protein in cirrhotic patients with marked immune and hemodynamic derangement. *Hepatology*. 2003;37:208-17.
8. Genesca J, Martí R, Rojo F, Campos F, Peribañez V, González A, et al. Increased tumour necrosis factor alpha production in mesenteric lymph nodes of cirrhotic patients with ascites. *Gut*. 2003;52:1054-9.
9. Albillos A, De la Hera A, Álvarez-Mon M. Serum lipopolysaccharide-binding protein prediction of severe bacterial infection in cirrhotic patients with ascites. *Lancet*. 2004;363:1608-10.
10. Muñoz L, Albillos A, Nieto M, et al. Mesenteric Th1 polarization and monocyte TNF-alpha production: first steps to systemic inflammation in rats with cirrhosis. *Hepatology*. 2005;42:411-9.
11. Turnbull E, MacPherson G. Immunobiology of dendritic cells in the rat. *Immunol Rev*. 2001;184:58-68.
12. Akira S, Takeda K, Kaisho T. Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity. *Nat Immunol*. 2001;2:675-80.
13. Dobrovolskaia MA, Vogel SN. Toll receptors, CD14, and macrophage activation and deactivation by LPS. *Microbes Infect*. 2002;4:903-14.
14. Young AJ. The physiology of lymphocyte migration through the single lymph node in vivo. *Semin Immunol*. 1999;11:73-83.
15. Tilg H, Wilmer A, Vogel W, et al. Serum levels of cytokines in chronic liver diseases. *Gastroenterology*. 1992;103:264-74.
16. Genesca J, Gonzalez A, Segura R, et al. Interleukin-6, nitric oxide, and the clinical and hemodynamic alterations of patients with liver cirrhosis. *Am J Gastroenterol*. 1999;94:169-77.
17. Albillos A, De la Hera A, Reyes E, et al. Tumour necrosis factor-alpha expression by activated monocytes and altered T-cell homeostasis in ascitic alcoholic cirrhosis: amelioration with norfloxacin. *J Hepatol*. 2004;40:624-31.
18. Frances R, Benlloch S, Zapater P, et al. A sequential study of serum bacterial DNA in patients with advanced cirrhosis and ascites. *Hepatology*. 2004;39:484-91.
19. Such J, Muñoz C, Zapater P, et al. Bacterial DNA induces a proinflammatory immune response in patients with decompensated cirrhosis. *Gut*. 2005;54:1500.
20. Tazi KA, Moreau R, Herve P, et al. Norfloxacin reduces aortic NO synthases and proinflammatory cytokine up-regulation in cirrhotic rats: role of Akt signaling. *Gastroenterology*. 2005;129:303-14.
21. Chin-Dusting JP, Rasaratnam B, Jennings GL, et al. Effect of fluoroquinolone on the enhanced nitric oxide-induced peripheral vasodilation seen in cirrhosis. *Ann Intern Med*. 1997;127:985-8.

Systemic Effects of TNF- α Secreted by Circulating Monocytes and Fatigue in Cirrhosis

To the Editor:

We read with interest the article by Kerfoot et al. describing a 1.8-fold expansion of circulating monocytes activated to tumor necrosis factor α (TNF- α) production 10 days after bile-duct resection in mice, and the accompanying editorial.^{1,2} Notably, activated monocytes are recruited into brain tissue by abnormally activated endothelial cells with subsequent activation of resident macrophages to TNF- α production. The authors hypothesize that the TNF- α delivered to the brain might contribute to the sickness behavior of cholestasis. We would like to point out that the key finding of Kerfoot's study, *i.e.*, an expansion in peripheral blood of TNF- α -secreting monocytes capable of infiltrating somatic tissues,³ is a characteristic shared by human and experimental cirrhosis,^{4,5} a disease in which fatigue is a prominent feature.⁶ In rats with CCl₄ cirrhosis and patients with cirrhosis, numbers of TNF- α -secreting monocytes in peripheral blood increase by 45- and 26-fold, respectively. The marked increase in TNF- α -secreting monocytes is accompanied by polarization of the T-helper cell compartment toward a Th1 pattern of activation with increased interferon- γ production.⁵ Expansion in the peripheral blood of these abnormally activated immune cells leads to increased serum levels of proinflammatory cytokines, including TNF- α , interferon- γ , interleukin (IL)-1 β , and IL-6.^{5,7,8} Experimental and clinical data have shown that immune cell activation initiates in the mesenteric lymph nodes and is promoted by gut bacterial translocation.^{4,5,8} Thereafter, the activated monocytes and T lymphocytes gain access to the peripheral blood by recirculation. Thus, the notion proposed in Kerfoot's article and the accompanying editorial would need to be explored in cirrhosis to establish the infiltration of brain tissue by activated monocyte/macrophages and their potential role in the pathogenesis of associated fatigue. In addition, we would like to draw attention to the possibility that the marked systemic inflammation demonstrated in cirrhosis may also be involved in the pathogenesis of fatigue, a proposal based on a combination of several known mechanisms including: (1) the combined direct effects on the brain of circulating pro-inflammatory cytokines elevated in cirrhosis, such as TNF- α , interferon- γ , IL-1 β , and IL-6; and (2) the direct skeletal muscle disturbance with increased proteolysis of muscle fibers provoked by TNF- α alone, or in combination with other cytokines such as interferon- γ .⁹ Immunological mechanisms underlie the pathogenesis of cholestasis and liver cirrhosis, and their complications including fatigue.^{1-5,8,10} Their unsuspected role in liver diseases, that were not previously considered immune-mediated, points to immune components as novel targets in translational medicine efforts directed to broaden therapeutic options.

AGUSTÍN ALBILLOS^{1,2}

LETICIA MUÑOZ¹

MÓNICA NIETO¹

MARÍA ÚBEDA¹

ANTONIO DE-LA-HERA¹

MELCHOR ALVAREZ-MON^{1,3}

¹Laboratorio de Enfermedades del Sistema Inmune
Unidad I+D Asociada al Centro Nacional de Biotecnología (CSIC)
Departamento de Medicina
Universidad de Alcalá

Alcalá de Henares, Madrid, Spain

²Servicio de Gastroenterología

Hospital Universitario Ramón y Cajal
Madrid, Spain

³Servicio de Enfermedades del Sistema Inmune y Oncología

Hospital Universitario Príncipe de Asturias
Alcalá de Henares, Madrid, Spain

References

1. Kerfoot SM, D'Mello C, Nguyen H, Ajuebor MN, Kubes P, Le T, et al. TNF- α -secreting monocytes are recruited into the brain of cholestatic mice. *HEPATOLOGY* 2006;43:154-162.
2. Aspinall AI, Adams DH. Sickness behaviour in chronic cholestasis: an immune-mediated process? *HEPATOLOGY* 2006;43:20-23.
3. Duffield JS, Forbes SJ, Constandinou CM, Clay S, Partolina M, Vuthoori S, et al. Selective depletion of macrophages reveals distinct, opposing roles during liver injury and repair. *J Clin Invest* 2005;115:56-65.
4. Albillos A, De la Hera A, Reyes E, Monserrat J, Muñoz L, Nieto M, et al. Tumour necrosis factor- α expression by activated monocytes and altered T-cell homeostasis in ascitic alcoholic cirrhosis: amelioration with norfloxacin. *J Hepatol* 2004;40:624-631.
5. Muñoz L, Albillos A, Nieto M, Reyes E, Lledo L, Monserrat J, et al. Mesenteric Th1 polarization and monocyte TNF- α production: first steps to systemic inflammation in rats with cirrhosis. *HEPATOLOGY* 2005;42:411-419.
6. Jones EA. Fatigue complicating chronic liver disease. *Metab Brain Dis* 2004;19:421-429.
7. Tilg H, Wilmer A, Vogel W, Herold M, Nolchen B, Judmaier G, et al. Serum levels of cytokines in chronic liver diseases. *Gastroenterology* 1992;103:264-274.
8. Albillos A, De la Hera A, González M, Moya JL, Calleja JL, Monserrat J, et al. Increased LBP in cirrhotic patients with marked immune and hemodynamic derangement. *HEPATOLOGY* 2003;37:208-217.
9. Acharyya S, Ladner KJ, Nelsen LL, Damrauer J, Reiser PJ, Swoap S, et al. Cancer cachexia is regulated by selective targeting of skeletal muscle gene products. *J Clin Invest* 2004;114:370-378.
10. Albillos A, De la Hera A, Alvarez-Mon M. Increased serum lipopolysaccharide-binding protein predicts severe bacterial infection in cirrhotic patients with ascites. *Lancet* 2004;363:1608-1610.

Copyright © 2006 by the American Association for the Study of Liver Diseases.

Published online in Wiley InterScience (www.interscience.wiley.com).

DOI 10.1002/hep.21205

Potential conflict of interest: Nothing to report.

Reply:

We appreciate the interest and points raised by Albillos and colleagues concerning our recent publication. We are very familiar with the body of literature identifying an increase in circulating TNF- α levels and numbers of TNF- α -producing monocytes in the setting of cirrhosis (and fully recognize the important contributions made by these authors in this area).^{1,2} Although we feel that our identification of similar findings in mice without cirrhosis is important, we do not feel that this is the "key finding" of our studies. We have identified that circulating TNF- α -producing monocytes are capable of interacting via specific adhesion molecules with activated endothelial cells, and subsequently infiltrating a tissue other than the liver, in the setting of experimental liver disease. Moreover, we have demonstrated in cholestatic mice that infiltration of the brain by TNF- α -secreting monocytes is associated with resident tissue macrophage (*i.e.*, microglia) activation and TNF- α production within the brain, and suggest that cytokines produced by these activated immune cells may be able to alter the normal function of the tissue in which they are produced (*i.e.*, change neurotransmission to induce fatigue). We do recognize, however, that cytokines released within the circulation are able to communicate with the brain (either directly or indirectly) to induce behavioral



The biological response modifier AM3 attenuates the inflammatory cell response and hepatic fibrosis in rats with biliary cirrhosis

Agustín Albillos, Mónica Nieto, María Ubeda, et al.

Gut 2010 59: 943-952 originally published online May 4, 2010
doi: 10.1136/gut.2008.168831

Updated information and services can be found at:
<http://gut.bmj.com/content/59/7/943.full.html>

These include:

References

This article cites 39 articles, 6 of which can be accessed free at:
<http://gut.bmj.com/content/59/7/943.full.html#ref-list-1>

Email alerting service

Receive free email alerts when new articles cite this article. Sign up in the box at the top right corner of the online article.

Notes

To order reprints of this article go to:
<http://gut.bmj.com/cgi/reprintform>

To subscribe to *Gut* go to:
<http://gut.bmj.com/subscriptions>

The biological response modifier AM3 attenuates the inflammatory cell response and hepatic fibrosis in rats with biliary cirrhosis

Agustín Albillos,^{1,2,3} Mónica Nieto,^{1,3} María Ubeda,^{1,3} Leticia Muñoz,^{1,3} Benito Fraile,⁴ Eduardo Reyes,^{1,3} Lourdes Lledó,⁵ Ignacio Blanco,⁶ Óscar Pastor,⁷ Clara Salas,⁸ Margaret Lario,^{1,3} Jorge Monserrat,^{1,3} Ramón Bataller,^{3,9} Melchor Álvarez-Mon^{1,3,10}

See Commentary, p 868

¹Laboratorio Enfermedades del Sistema Inmune, Departamento de Medicina, Facultad de Medicina, Universidad de Alcalá, Alcalá de Henares, Madrid, Spain

²Servicio de Gastroenterología, Hospital Universitario Ramón y Cajal, Universidad de Alcalá, Madrid, Spain

³Centro de Investigación Biomédica en Red en Enfermedades Hepáticas y Digestivas (Ciberehd), Instituto de Salud Carlos III, Spain

⁴Departamento de Biología Celular y Genética, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad de Alcalá, Alcalá de Henares, Madrid, Spain

⁵Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Farmacia, Universidad de Alcalá, Alcalá de Henares, Madrid, Spain

⁶Servicio de Bioquímica Clínica, Hospital Universitario Ramón y Cajal, Universidad de Alcalá, Madrid, Spain

⁷Servicio de Anatomía Patológica, Hospital Universitario Puerta de Hierro-Majadahonda, Universidad Autónoma de Madrid, Madrid, Spain

⁸Servicio de Hepatología, Hospital Clinic, Instituto de Investigación Biomédica Augusto Pi Suñer, Barcelona, Spain

⁹Servicio de Enfermedades del Sistema Inmune y Oncología, Hospital Universitario Príncipe de Asturias, Universidad de Alcalá, Alcalá de Henares, Madrid, Spain

Correspondence to

Professor Agustín Albillos, Departamento de Medicina, Facultad de Medicina-Campus Universitario, Universidad de Alcalá, Carretera Madrid-Barcelona km. 33.600, 28871 Alcalá de Henares, Madrid, Spain; aalbillosm@meditex.es

AA and MN contributed equally to this work and share first authorship.

Revised 7 October 2009

Accepted 10 November 2009

ABSTRACT

Background An inflammatory immune system response ensues in the liver and in the systemic circulation in cirrhosis, where it contributes to hepatic fibrosis and peripheral vasodilation. Modulation of the inflammatory response without increasing susceptibility to infection is a therapeutic target in cirrhosis. AM3 is a low-toxicity biological response modifier with regulatory effects on innate and adaptative immunity, and the ability to normalise the production of tumour necrosis factor α (TNF α).

Aims This was an experimental study to investigate the effects of oral AM3 on the systemic and hepatic inflammatory response, liver fibrosis and on the haemodynamic abnormalities of portal hypertension in rats with biliary cirrhosis.

Design Bile-duct ligated rats received a 3-week oral course of AM3 or placebo.

Results In cirrhotic rats, AM3 blunted the inflammatory switch of circulating and intrahepatic monocytes and T-cells to TNF α and interferon γ (IFN γ) production, respectively. AM3 modified the intrahepatic polarisation pattern of the regulatory cytokines, decreasing the mRNA expression of transforming growth factor β 1 (TGF β 1), interleukin 4 (IL4), and IFN γ , and increasing that of IL10. Total and IFN γ -producing natural killer (NK) cells were lowered by AM3 in the peripheral blood and liver of cirrhotic rats. The immunomodulatory effects of AM3 led to reduced hepatic fibrogenesis in cirrhotic rats, as shown by decreased area of liver fibrosis, hydroxyproline content and mRNA expression of procollagen α 1(I). Besides, AM3 lowered portal pressure and systemic hyperaemia.

Conclusions The biological response modifier AM3 reverses the concurrent inflammatory immune system activation in peripheral blood and liver of experimental established cirrhosis, which results in reductions of hepatic fibrosis, portal pressure and peripheral vasodilation.

INTRODUCTION

Hepatic inflammation to repeated injury and repair is at the root of hepatic fibrosis.¹ The inflammatory process that results from injury is characterised by the production of soluble mediators, including cytokines.² Prior clinical and experimental evidence indicates that the inflammatory response in cirrhosis is not restricted to the liver, but extends to the systemic circulation. Thus, patients and animal models of cirrhosis show a marked increase in peripheral blood of tumour necrosis factor α (TNF α)-

Significance of this study

What is already known about this subject?

- ▶ An inflammatory response with production of cytokines is present in the systemic circulation of experimental models and patients with cirrhosis.
- ▶ The combined effects on the tissues of cytokines and infiltrating immune system cells contributes to the progression of hepatic inflammation and fibrogenesis and to the haemodynamic derangement of cirrhosis.
- ▶ AM3 is a biological response modifier with regulatory effects on innate and adaptative immunity in experimental and clinical models of inflammation and disease.

What are the new findings?

- ▶ Concurrent proinflammatory polarisation of the monocyte and T lymphocyte compartments in peripheral blood and liver of rats with biliary cirrhosis.
- ▶ Reversibility of the inflammatory immune system activation at the hepatic and systemic level by oral treatment with the biological response modifier, AM3.
- ▶ Immune system reprogramming by AM3 ameliorates hepatic inflammation and fibrosis, portal hypertension and associated haemodynamic abnormalities.

How might it impact on clinical practice in the foreseeable future?

- ▶ Modulation of the immune system response might improve outcomes in cirrhosis, and constitute a novel therapeutic strategy.

secreting monocytes, polarisation of the T-helper (Th) cell compartment towards a Th1 pattern of activation with increased interferon γ (IFN γ) production and elevated serum proinflammatory cytokines.^{3–6} This state determines that the combined effects on the tissues of cytokines and infiltrating activated immune system cells could contribute to the progression of hepatic inflammation and fibrogenesis and to the complications of cirrhosis.^{7–9} Specifically, the intense lipopolysaccharide (LPS)-driven cytokine release observed in

advanced cirrhosis aggravates portal hypertension and peripheral vasodilation, and worsens patient survival.^{4 10}

Given the pathogenic role of inflammation in tissue damage and in the haemodynamic derangement of cirrhosis, modulation of the inflammatory response is a therapeutic target. Attempts at this have included intestinal bacterial decontamination, which reduces the passage of bacterial products, such as LPS, to the systemic circulation, decreases TNF α production by activated immune system cells, and attenuates peripheral vasodilation.^{4–6 9 11} Development of resistant bacterial strains and opportunistic infections preclude the long-term use of antibiotics. An alternative is the use of agents able to target pathogenically relevant cytokines, such as TNF α . Anti-TNF α antibodies down-regulate endothelial activation and improve peripheral vasodilation in rats with portal hypertension or cirrhosis.^{9 12 13} However, most drugs targeted at TNF α also block bioavailable TNF α produced by monocytes and T cells,^{14 15} increasing susceptibility to bacterial infection.¹⁶ AM3 is a biological response modifier with a low toxicity profile,^{17 18} whose active ingredients are a glycoconjugate composed of an α -glucmannan polysaccharide from *Candida utilis* and the storage protein Ricc3 from *Ricinus communis*.¹⁹ AM3 shows a wide range of regulatory effects on innate and adaptive immunity in experimental and clinical models of inflammation and disease.^{20–23} In these settings, AM3 normalises the production of TNF α .^{24 25}

The present study first investigates the effects of oral treatment with AM3 on the systemic and hepatic inflammatory response in rats with established biliary cirrhosis. Hepatic inflammation activates stellate cells and collagen production; if iterative, this process leads to hepatic fibrosis and portal hypertension. Our second aim was, therefore, to assess the impact of AM3 treatment on liver fibrosis and the haemodynamic abnormalities of portal hypertension.

MATERIALS AND METHODS

Animal model

Cirrhosis was induced in male Wistar rats (140–160 g initial weight) by transecting the common bile duct between two ligations under isoflurane anaesthesia (Forane; Abbott Laboratories, Madrid, Spain). Experiments were performed 6 weeks after bile duct ligation (range, 40–46 days) to allow for the development of cirrhosis with ascites.

Study design and experimental protocols

AM3 is the non-covalent association of a phosphorylated glucmannan from the cell wall of *Candida utilis* and the storage protein Ricc3 from *Ricinus communis* seeds in a 5:1 proportion (w/w), and was prepared according Patents P9900408 (Spain) and PCT/ES99/00338.^{23–25} The study was conducted as three protocols designed to investigate the long-term effects of AM3: (1) on the activation state and polarisation pattern of cytokine production of T lymphocytes, natural killer (NK) cells and monocyte populations in peripheral blood and liver, as well as on the plasma levels and hepatic expression of cytokines; (2) on hepatic fibrogenesis; and (3) on portal pressure and systemic haemodynamics. Eighty-five bile-duct ligated rats were randomised to receive a 3-week oral course of AM3 (3 mg/kg dissolved in 0.5 ml distilled water) or placebo (vehicle), started 4 weeks after ligation. Mortality was 15%, and the final number of rats included was 33 and 40 in the placebo- and AM3-treated groups, respectively. Additionally, a control group of 32 sham-operated, age- and sex-matched rats was randomised (1:1) to receive

a 3-week course of AM3 or placebo, started 4 weeks after sham surgery.

Experiments were conducted in sterile conditions in fasted animals under isoflurane anaesthesia. In protocol 1, the abdomen was opened, and blood (5–15 ml) withdrawn from the inferior vena cava. Subsequently, the portal vein was cannulated, and the liver perfused with prewarmed digestion buffer, and the mesenteric lymph nodes (MLNs) dissected and cultured. In protocol 2, rats were instrumented with catheters in the femoral and carotid arteries and portal vein; a section of the liver was harvested and fixed in formalin or snap-frozen in liquid nitrogen.

Methods

Activation state and cytokine production of peripheral blood and intrahepatic mononuclear cells

Peripheral blood mononuclear cells were separated by Histo-paque-1083 (Sigma-Aldrich, St Louis, Missouri, USA) density gradient centrifugation. Intrahepatic mononuclear cells were obtained by a modification of the method of Crispe.²⁶ Briefly, perfused livers were cut into small pieces, which were digested with media containing collagenase (Type I; Invitrogen, Paisley, UK and type IV; Sigma-Aldrich) and DNase I (Roche, Mannheim, Germany). The resultant liver cell suspension was passed through a stainless mesh and centrifuged to obtain a cell pellet depleted of hepatocytes.

Monocyte, NK and T cell subpopulations were determined in cell suspensions from peripheral blood and liver by four-colour immunofluorescence and quantitative flow cytometry in a FACScalibur cytometer using Cell Quest software (Becton-Dickinson, San Jose, CA, USA). Surface and intracellular antigen expression were quantified using a modification of the Dako QifKit method (Dako A/S, Glostrup, Denmark), as described elsewhere.⁶ Analyses were conducted by FlowJo software (Tree Star, San Carlos, CA, USA). Cell suspensions were incubated with combinations of fluorescein (FITC)-, phycoerythrin (PE)-, peridinin chlorophyll protein (PerCP)-, allophycocyanin (APC)- and AlexaFluor647-labelled monoclonal antibodies. The rat monoclonal antibodies (BD Pharmingen, San Diego, CA, USA and Serotec, Oxford, UK) used were: CD3 (1F4), CD4 (OX-38), CD8 α (OX8), CD134 (OX-40), CD45RC (OX-22), NKR-P1A (10/78) and CD11b (OX-42). After surface staining, cells were fixed and permeabilised, and intracytoplasmic cytokines stained with PE-labelled anti-TNF α or anti-IFN γ (Pharmingen, San Diego, CA, USA), as described.⁶ Intracytoplasmic cytokine production was determined for T and NK cells in the presence of phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA, 0.05 μ g/ml; Sigma Chemical Co., St Louis, MO, USA) and ionomycin (1 μ g/ml; Calbiochem-Novabiochem Corp., San Diego, CA, USA) and for monocytes without stimulus.⁶ Immune cells in peripheral blood and liver were counted in a Neubauer chamber. Absolute cell counts were calculated by multiplying the absolute number by the proportion of each subpopulation established by flow cytometry.

Plasma levels of cytokines, TNF α bioactivity in serum, endotoxin, and liver function tests

Samples of peripheral blood were centrifuged and serum aliquots stored at -80°C . Elisa kits (Biosource International, Camarillo, CA, USA) were used to determine TNF α and IFN γ . TNF α bioactivity in serum was also measured using the TNF α -sensitive L929 fibroblast cell line, as described.²⁷ Serum levels of endotoxin were assayed using the quantitative, chromogenic Limulus Amebocyte Lysate (LAL) test (QCL-1000; BioWhittaker

Inc, Walkersville, Maryland, USA). Serum concentrations of bilirubin, albumin, aspartate and alanine aminotransferases, alkaline phosphatase, and urea were measured using an automatic analyser (Beckman Coulter, Villepinte, France).

Bacteriological analysis

Samples of MLN cell suspensions were plated on McConkey and blood agar plates (Materlab, Madrid, Spain). Gut bacterial translocation was defined as the presence of viable organisms in the MLN cultures.

Liver fibrosis and immunostaining

Histology

Formalin-fixed liver sections were stained with haematoxylin–eosin, and with picrosirius red for routine and fibrosis evaluation, respectively. Histological grading was assessed as: stage 0, normal lobular architecture; stage I, expansion of portal tracts by marginal biliary proliferations; stage II, portal tract expansion with focal contact between ductular proliferations of neighbouring portal tract; stage III, portal tract expansion with broad contacts between ductular proliferations generating hepatocyte islands; and stage IV, biliary cirrhosis with entrapment of residual hepatocytes by extensive ductular proliferation.²⁸

Immunohistochemical studies

Snap-frozen liver sections were incubated with anti-smooth muscle α -actin (SMA) (1:500; Sigma–Aldrich), and E-cadherin (1:100; BD Transduction Lab, BD Bioscience, San José, CA, USA) for 30 min at room temperature. As negative controls, all specimens were incubated with an isotype-matched control antibody. Slides were developed in liquid permanent red (DakoCytomation).²⁹ Values of morphometric analysis were the mean of 10 fields taken from five liver fragments per rat, and the area of positive staining was measured using an image analyser (Motic Images Advanced version 3.2, Motic China Group Co., Xiamen, China).

Hydroxyproline liver concentration

Hepatic collagen was measured as hydroxyproline by the technique of Bergman and Loxley with slight modifications after hydrolysis of a 200-mg portion of liver in 5 ml of 6 N HCl at 110°C for 16 h, as previously described.³⁰ The results were expressed as micrograms hydroxyproline per gram liver.

RNA extraction and real time-PCR

Gene expression studies were performed as described elsewhere.³¹ Gene expression was assessed by quantitative PCR with pre-designed Assays-on-Demand TaqMan probes and primer pairs for procollagen α 1(I), transforming growth factor β 1 (TGF β 1), tissue inhibitor of metalloproteinase 1 (TIMP-1), interleukin 4 (IL4) and IL10, IFN γ and ribosome subunit 18S. TaqMan reactions were carried out in duplicate on an ABI PRISM 7900 machine (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Expression levels of target genes were normalised to expression of 18S ribosomal RNA (endogenous gene). Gene expression values were calculated based on the $\Delta\Delta C_t$ method. The results were expressed as $2^{-\Delta\Delta C_t}$ referred as fold-expression compared to control livers.

Portal pressure and systemic haemodynamics

Mean arterial and portal venous pressures were measured, respectively, through the femoral artery and superior mesenteric vein catheters, which were connected to pressure transducers (Lectromed Holding, St Peters, Jersey, UK), as described.¹² Cardiac

output was determined by thermodilution (Columbus Instruments, Columbus, Ohio, USA), placing a thermistor in the aortic arch and injecting a thermal indicator into the right atrium. Cardiac index (ml/min.100 g) was calculated as cardiac output per 100 g body weight. Systemic vascular resistance (ml/min.100 g) was calculated as mean arterial pressure divided by cardiac index.

Statistical analysis

Results are shown as mean (SD). Data were compared by one-way ANOVA, followed by a posthoc *t* test (Bonferroni). The Student *t* test for unpaired data was used for comparisons among groups. Qualitative variables were analysed using Fisher's exact test. A value of $p < 0.05$ was taken to denote significance. Statistical analysis was performed using the Stat-View package (Abacus Concepts, Berkeley, CA, USA).

RESULTS

Similar proinflammatory immune system response in peripheral blood and liver in rats with biliary cirrhosis

At 6 weeks, bile-duct ligation resulted in biliary cirrhosis (figures 1 and 2), which was characterised by severe distortion of liver architecture, massive bile duct proliferation, and entrapment of hepatocytes by fibrotic tissue. The frequency of liver fibrogenic cells (SMA positive) was higher in placebo-treated cirrhotic rats compared to sham animals (figure 1). Hepatic collagen, as quantified by the expression of procollagen α 1(I) and hydroxyproline content, was increased in cirrhotic rats (figure 3). Placebo-treated cirrhotic rats had elevated values of serum aspartate aminotransferase and alkaline phosphatase (table 1). On the experimental day, placebo-treated cirrhotic rats had ascites, and had developed elevated portal pressure and features of a hyperdynamic circulatory state; that is, elevated cardiac index, low mean arterial pressure and systemic vascular resistance (figure 4).

Placebo-treated cirrhotic rats showed considerable expansion (by 74-fold, $p < 0.001$) of monocytes spontaneously activated to TNF α production in peripheral blood. The latter was the result of increased frequencies of CD11b^{bright} monocytes producing TNF α (51 (14) vs 12 (9)% in sham rats, $p < 0.01$) and expansion of the total number of circulating CD11b^{bright} monocytes (by 18-fold, $p < 0.001$) (table 2). The expanded population of circulating CD11b^{bright} monocytes showed signs of activation, as defined by surface phenotype (CD4-NKR-P1A^{low}). As illustrated in table 2, the population of CD11b^{bright} monocytes producing TNF α was increased by 2.2-fold in the liver of cirrhotic rats as a consequence of the augmented frequency of TNF α producing cells (8.7 (3.2) vs 5.6 (2.3)%, $p < 0.01$) and increased number of total monocytes.

Parallel analysis of the T cell compartment revealed 4- and 9-fold increases ($p < 0.001$) in the populations of circulating Th cells polarised to TNF α and IFN γ production, respectively, in placebo-treated cirrhotic compared to sham rats (table 3). Besides, the number of CD134⁺ Th cells, a marker of recent activation, increased by 25-fold ($p < 0.001$) and its percentage by 5-fold (6.8 (2.5) vs 1.3 (0.8)%, $p < 0.01$). In agreement with the findings in peripheral blood, the population of IFN γ -producing Th cells was expanded by fourfold ($p < 0.01$) in the liver of cirrhotic rats. Similar results, albeit less striking, were observed in the circulating and intrahepatic population of the Tc subset (table 3).

The number of NK cells in peripheral blood and their IFN γ -polarised subset was increased ($p < 0.01$) by 10- and 18-fold, respectively, in placebo-treated cirrhotic compared to sham rats (table 3). In contrast, the liver of cirrhotic rats showed a reduction in the number of NK cells (table 3). The number of

Hepatology

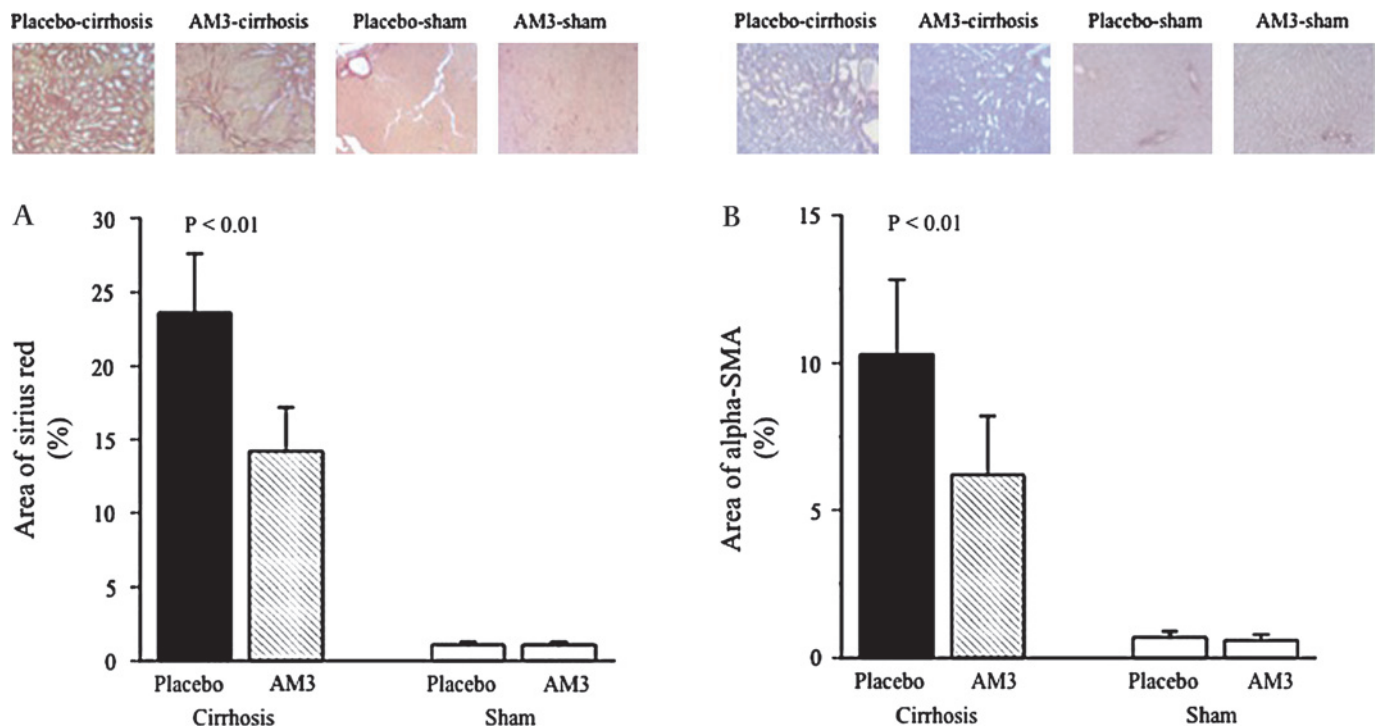


Figure 1 AM3 reduces fibrosis associated with biliary cirrhosis. (A) Picrosirius red staining (magnification $\times 40$). (B) Expression of smooth muscle α -actin (SMA) (magnification $\times 200$). Graphs show quantification of fibrosis and immunopositive cell areas by morphometry. * $p < 0.05$ for AM3- and placebo-treated rats with cirrhosis.

intrahepatic IFN γ -producing NK cells was similar in cirrhotic and sham rats.

AM3 diminishes the peripheral blood and liver inflammatory immune response in rats with biliary cirrhosis

AM3 reduced, but did not normalise, the number (by 10-fold) and frequencies of circulating CD11b^{bright} monocytes producing

TNF α in cirrhotic rats (51 (14) vs 26 (10)%, $p < 0.01$) (table 2). Besides, AM3 diminished ($p < 0.001$) the number of activated (CD4⁺NKR-P1A^{low}) CD11b^{bright} monocytes in peripheral blood. Table 3 illustrates that AM3 significantly blunted the expansion of recently activated CD134⁺ Th cells (6.8 (2.5) vs 3.1 (1.3)%, $p < 0.01$) and of Th cells polarised to IFN γ production (5.7 (2.7) vs 1.5 (0.8)%, $p < 0.05$). Interestingly, AM3 therapy did not

Figure 2 AM3 lowers the number of bile ducts in rats with biliary cirrhosis. Anti-E-cadherin immunostaining was used as a marker of bile ducts, thus staining is exclusively observed the epithelial cells of the bile ducts (magnification $\times 200$, insert $\times 600$). (A) Placebo-treated cirrhotic rats. (B) AM3-treated cirrhotic rats. (C) Placebo-treated control rats. (D) AM3-treated control rats.

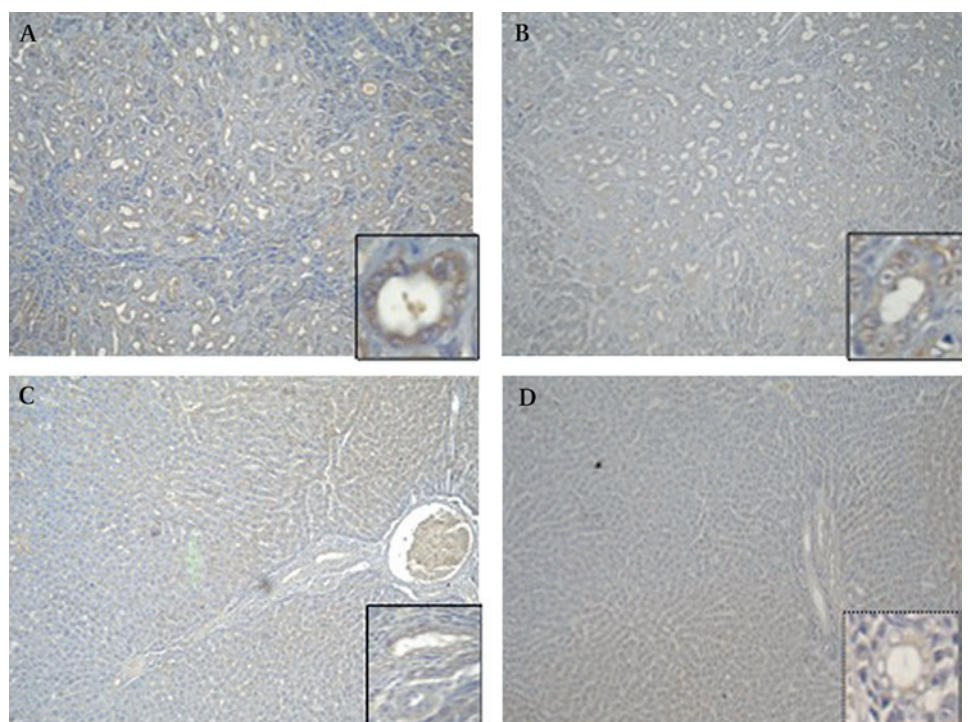
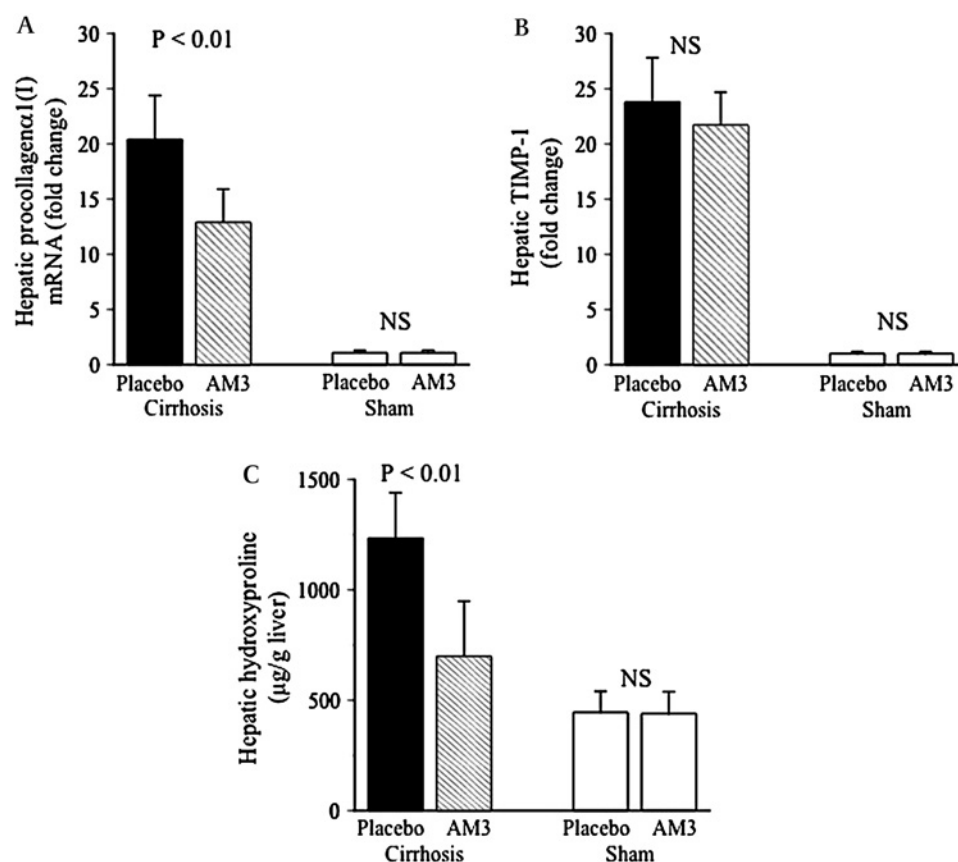


Figure 3 AM3 reduces the hepatic collagen content in rats with biliary cirrhosis. (A) Hepatic mRNA expression of procollagen $\alpha 1(I)$. (B) Hepatic mRNA expression of tissue inhibitor of metalloproteinase 1 (TIMP-1). (C) Hepatic collagen measured as hydroxyproline.



modify the number of Th and Tc cells able to produce TNF α on PMA stimulation. In addition, AM3 decreased ($p < 0.001$) the number of circulating NK cells, including the IFN γ -producing subset (table 3). In accordance with the effects on circulating immune system cells, AM3 treatment reduced ($p < 0.001$) the increased serum levels of proinflammatory cytokines observed in cirrhotic rats (table 4).

AM3 treatment lowered the number of intrahepatic CD11b^{bright} monocytes activated to TNF α production (by 2.8-fold, $p < 0.001$) and of those expressing NKR-P1A^{low} (by 1.7-fold, $p < 0.001$) (table 2). Such an effect was not only due to a 1.9-fold ($p < 0.001$) reduction in the total number of intrahepatic CD11b^{bright} monocytes by AM3 in cirrhotic rats, but also to

reductions in the frequencies of CD11b^{bright} cells producing TNF α (8.7 (3.6) vs 4.7 (2.8)%, $p < 0.01$) and expressing NKR-P1A^{low} (31 (14) vs 20 (9)%, $p < 0.01$). AM3 also had an impact on the intrahepatic T cell compartment, by blunting the expansion of recently activated Th cells (CD134⁺, by twofold, $p < 0.05$), and of Th and Tc cells polarised to IFN γ production (by 3.5 and 5.1, $p < 0.001$, respectively) (table 3). AM3 reduced the number of total (by twofold, $p < 0.01$) and IFN γ -producing (by sevenfold, $p < 0.001$) NK cells in the liver of cirrhotic rats (table 3).

We also investigated the effects of AM3 on the cytokine polarisation pattern of the intrahepatic immune cell response. The liver of AM3-treated cirrhotic rats displayed a twofold

Table 1 Weight, bacterial translocation and liver biochemical tests in placebo- and AM3-treated cirrhotic and sham rats

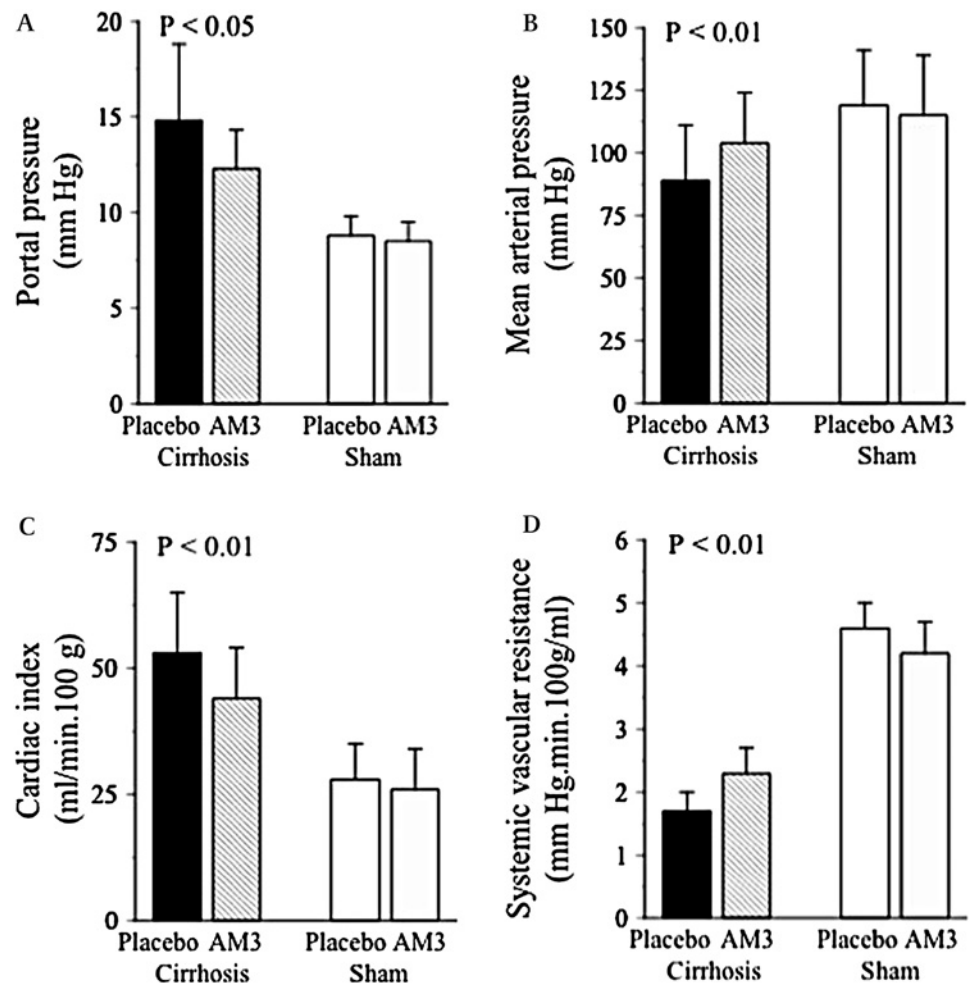
	Cirrhotic rats			Sham rats		
	Placebo-treated (n = 26)	AM3-treated (n = 29)		Placebo-treated (n = 12)	AM3-treated (n = 12)	
Weight (g)	306 (31)	300 (24)	NS	295 (25)	284 (29)	NS
Liver weight (g)	25.9 (2.4)	20.9 (1.8)	$P < 0.001$	8.8 (0.7)	8.7 (0.8)	NS
Spleen weight (g)	1.92 (0.71)	1.28 (0.6)	$P < 0.001$	0.68 (0.07)	0.62 (0.06)	NS
Bacterial translocation to mesenteric lymph nodes	6.2%	5.8%	NS	0%	0%	NS
Endotoxin/EU/ml	0.42 (0.09)	0.39 (0.08)	NS	0.10 (0.02)	0.12 (0.03)	NS
Mortality	19%	17%	NS	0%	0%	NS
Serum bilirubin (mg/dl)	3.54 (1.31)	4.07 (1.11)	NS	0.02 (0.01)	0.04 (0.01)	NS
Serum albumin (g/dl)	1.42 (0.64)	1.43 (0.41)	NS	2.85 (0.36)	2.98 (0.4)	NS
Serum aspartate aminotransferase (IU/ml)	242 (129)	176 (77)	$P < 0.02$	41 (23)	38 (19)	NS
Serum alanine aminotransferase (IU/ml)	28.7 (23)	28.3 (22)	NS	24 (9)	26 (8)	NS
Serum alkaline phosphatase (IU/ml)	375 (132)	228 (98)	$P < 0.001$	89 (18)	82 (16)	NS
Serum urea (mg/dl)	50.1 (29)	42.7 (16)	NS	27 (11)	24 (9)	NS

Data from animals instrumented in protocols 1 and 2.

NS, not significant.

Hepatology

Figure 4 AM3 reduces portal pressure and attenuates the hyperdynamic circulatory state in rats with biliary cirrhosis. (A) Portal pressure. (B) Mean arterial pressure. (C) Cardiac index. (D) Systemic vascular resistance.



decrease ($p < 0.01$) in the mRNA expression of TGF β 1, IL4 and IFN γ , and a nearly twofold increase ($p < 0.01$) in the expression of IL10 when compared with placebo-treated cirrhotic animals (figure 5).

Contrary to the immunomodulatory effect of AM3 in cirrhotic rats, treatment failed to significantly modify the circulating and intrahepatic number of activated monocytes, and NK and T cells of control rats (tables 2 and 3).

The immunomodulatory effect of AM3 treatment in cirrhotic rats leads to reductions in hepatic fibrosis, portal pressure and the haemodynamic features of a hyperdynamic circulatory state. In AM3-treated cirrhotic rats, distortion of liver architecture was less pronounced than in their placebo-treated counterparts (figure 1). AM3 decreased the stage of inflammation and fibrosis from a score of 3.6 (1.4) to 2.4 (1.1) points ($p < 0.01$). Besides, the number of bile ducts was lower in AM3- than in

Table 2 Immunophenotypic profile of circulating and intrahepatic monocytes of placebo- and AM3-treated cirrhotic and sham rats

	Cirrhotic rats			Sham rats		
	Placebo-treated (n = 14)	AM3-treated (n = 15)		Placebo-treated (n = 12)	AM3-treated (n = 12)	
Peripheral blood (cells/ μ l)						
Monocytes (CD3 ⁺ CD11b ^{bright+})	1303 (775)*	253 (97)‡	p<0.001	72 (66)	50 (64)	NS
Activated monocytes as defined by surface phenotype (CD4 ⁺ NKR-P1A ^{low})	95 (43)*	35 (16)‡	p<0.001	11 (11)	9.7 (4.2)	NS
Monocytes spontaneously activated to TNF α production (TNF α ⁺)	668 (247)*	65 (39)‡	p<0.001	9.1 (3)	6.8 (4)	NS
Intrahepatic immune cell subsets (cells/liver $\times 10^{-3}$)						
Monocytes (CD3 ⁺ CD11b ^{bright+})	7259 (2351)†	3634 (1020)	p<0.001	4739 (1824)	4088 (1014)	NS
Activated monocytes as defined by surface phenotype (NKR-P1A ^{low})	1521 (642)*	1011 (485)§	p<0.02	742 (239)	684 (249)	NS
Monocytes spontaneously activated to TNF α production (TNF α ⁺)	697 (341)†	248 (109)	p<0.001	310 (180)	296 (128)	NS

* $p < 0.001$ versus placebo-treated sham rats.

† $p < 0.01$ versus placebo-treated sham rats.

‡ $p < 0.001$ versus AM3-treated sham rats.

§ $p < 0.05$ versus AM3-treated sham rats.

Table 3 Immunophenotypic profile of circulating and intrahepatic T and NK cells of placebo- and AM3-treated cirrhotic and sham rats

	Cirrhotic rats			Sham rats		
	Placebo-treated (n = 14)	AM3-treated (n = 15)		Placebo-treated (n = 12)	AM3-treated (n = 12)	
Peripheral blood (cells/ μ l)						
T cells (CD3 ⁺)	2110 (1155)*	1311 (773)‡	p<0.03	677 (354)	593 (314)	NS
Total T helper (Th, CD4 ⁺)	1608 (795)*	958 (631)§	p<0.02	483 (304)	430 (372)	NS
Recently activated Th (CD134 ⁺)	93 (57)*	40 (22)‡	p<0.01	3.6 (2.2)	5.6 (4.2)	NS
Recall TNF α production by Th cells (TNF α ⁺)	30.3 (14)*	24.6 (9.6)‡	NS	7.92 (3.4)	7.23 (3.9)	NS
Recall IFN γ production by Th cells (IFN γ ⁺)	91 (32)*	14 (6)	p<0.001	10.1 (7)	12.3 (8)	NS
Total T cytotoxic (Tc, CD8 ⁺)	467 (240)*	306 (142)‡	p<0.03	196 (101)	147 (118)	NS
Activated Tc (NKR-P1A ⁺)	199 (87)*	101 (66)‡	p<0.01	37 (21)	29 (32)	NS
Recall TNF α production by Tc cells (TNF α ⁺)	22.7 (11)*	17.8 (9)‡	NS	6.86 (3.8)	6.02 (3.3)	NS
Recall IFN γ production by Tc cells (IFN γ ⁺)	87 (41)*	25 (11)	p<0.001	22 (14)	26 (10)	NS
NK cells (CD3 ⁺ NKR-P1A ^{high})	1301 (789)*	537 (214)‡	p<0.001	120 (63)	91 (52)	NS
Recall IFN γ production by NK cells (IFN γ ⁺)	582 (243)*	142 (52)‡	p<0.01	31 (12)	24 (12)	NS
Intrahepatic immune cell subsets (cells/liver $\times 10^{-3}$)						
T cells (CD3 ⁺)	10209 (4432)*	4663 (2560)	p<0.001	4618 (1918)	5504 (1601)	NS
Total T helper (Th, CD4 ⁺)	6673 (2196)*	3285 (1348)	p<0.001	2960 (1381)	3135 (1683)	NS
Recently activated Th (CD134 ⁺)	987 (429)*	562 (236)‡	p<0.01	145 (97)	133 (89)	NS
Recall IFN γ production by Th cells (IFN γ ⁺)	1736 (687)*	486 (209)	p<0.001	412 (181)	391 (211)	NS
Total T cytotoxic (Tc, CD8 ⁺)	2299 (1054)†	944 (686)	p<0.001	1506 (749)	1212 (925)	NS
Activated Tc (CD45RC ⁺)	1717 (846)*	708 (407)	p<0.001	509 (366)	687 (427)	NS
Recall IFN γ production by Tc cells (IFN γ ⁺)	922 (472)*	481 (284)	p<0.01	338 (179)	357 (176)	NS
NK cells (CD3 ⁺ NKR-P1A ^{high})	2174 (1014)*	1293 (725)‡	p<0.01	4206 (2271)	5038 (3001)	NS
Recall IFN γ production by NK cells (IFN γ ⁺)	1414 (120)*	183 (91)‡	p<0.001	1618 (794)	1729 (847)	NS

*p<0.001 versus placebo-treated sham rats.

†p<0.05 versus placebo-treated sham rats.

‡p<0.001 versus AM3-treated sham rats.

§p<0.05 versus AM3-treated sham rats.

placebo-treated cirrhotic rats (44.1 ± 6.4 vs $56.2 \pm 7.0\%$, $p < 0.001$) (figure 2).

AM3 therapy decreased ($p < 0.01$) the fibrosis area by 1.7-fold and the number of SMA-positive cells by 1.6-fold (figure 1). The antifibrogenic effect of AM3 was supported by reductions ($p < 0.01$) by twofold in the hepatic hydroxyproline content and by 1.6-fold in the mRNA expression of procollagen $\alpha 1(I)$, without changes in the TIMP-1 expression (figure 3).

AM3 therapy lowered serum aspartate transaminase (AST) and alkaline phosphatase, without modifying endotoxaemia and the mortality rate (table 1). Further, AM3 was associated with a reduction in portal pressure from 14.8 (1.4) to 12.3 (1.2) mm Hg (-16.8 (5.3)%, $p < 0.03$) (figure 4). Treatment increased mean arterial pressure by $+15.3$ (7)% ($p < 0.01$), decreased cardiac index by -12.6 (6)% ($p < 0.01$), and in consequence increased systemic vascular resistance by $+26.1$ (12)% ($p < 0.01$).

DISCUSSION

The findings of this experimental study in a rat model of fully developed cirrhosis indicate: (1) concurrent proinflammatory polarisation of the monocyte and T lymphocyte compartments in peripheral blood and liver; (2) the reversibility of this inflammatory immune system alteration by oral treatment with a biological response modifier, AM3; and (3) that immune system reprogramming by AM3 ameliorates hepatic inflammation and fibrosis, portal hypertension and associated haemodynamic abnormalities.

In our experimental model, bile duct injury leads to progressive portal fibrosis and finally cirrhosis, portal hypertension and ascites. These abnormalities show a predictable and reproducible time course after bile-duct ligation such that the model is suitable for testing novel therapies. It should be underscored that our experimental design was targeted at determining the impact

Table 4 Serum level of cytokines in placebo- and AM3-treated cirrhotic and sham rats

	Cirrhotic rats			Sham rats		
	Placebo-treated (n = 26)	AM3-treated (n = 29)		Placebo-treated (n = 12)	AM3-treated (n = 12)	
TNF α (pg/ml)	66 (33)*	38 (18)‡	p<0.001	12 (9)	10 (8)	NS
Biological activity of TNF α (IU/ml)	378 (136)*	80 (38)‡	p<0.001	20 (11)	21 (12)	NS
IFN γ (pg/ml)	87 (28)	25 (11)	p<0.001	Below detection limit	Below detection limit	

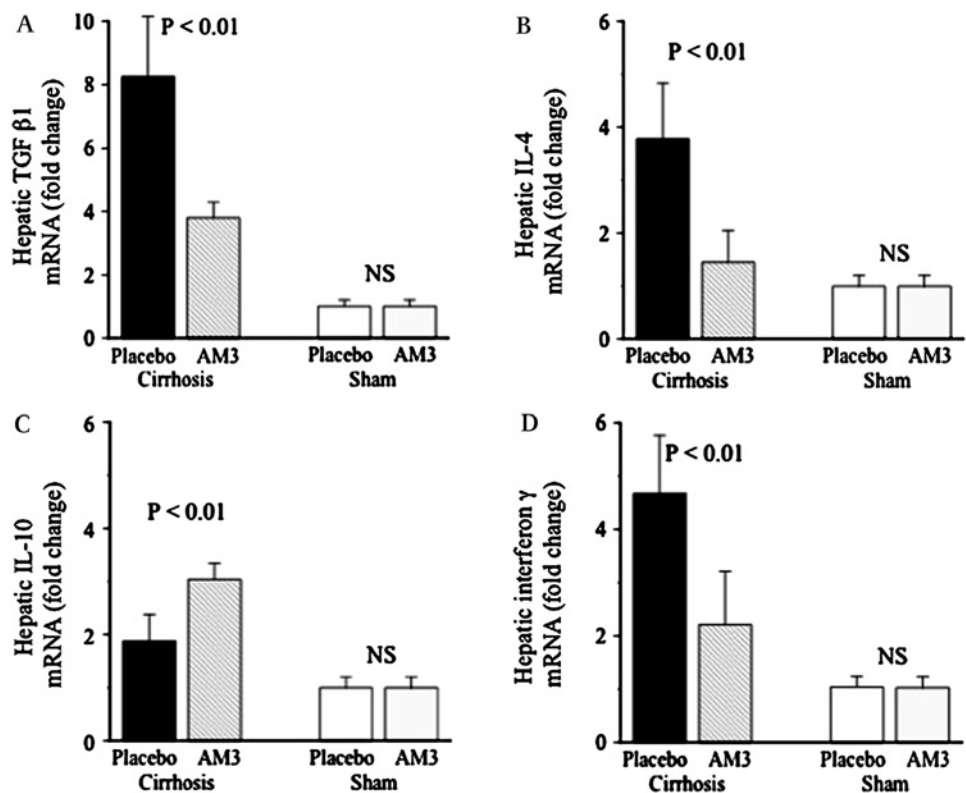
Data from animals instrumented in protocols 1 and 2.

*p<0.001 versus placebo-treated sham rats.

†p<0.05 versus placebo-treated sham rats.

‡p<0.001 versus AM3-treated sham rats.

Figure 5 AM3 modifies the intrahepatic mRNA expression of immunoregulatory cytokines. (A) Transforming growth factor β 1 (TGF β 1). (B) Interleukin 4. (C) Interleukin 10. (D) Interferon γ .



of therapy once cirrhosis is established, in an effort to approach the clinical situation.

As far as we are aware, this is the first attempt to simultaneously address the activation patterns of circulating and liver-infiltrating inflammatory cells in this model of cirrhosis. Our results reveal a marked expansion in peripheral blood of TNF α -secreting monocytes, T cells polarised to a Th1 activation pattern, and IFN γ -producing NK cells, which leads to increased serum levels of proinflammatory cytokines, in agreement with previously described findings in rats with CCl $_4$ cirrhosis and patients with cirrhosis.^{4–7} The present work also demonstrates that the abnormal immune system response is not restricted to the peripheral blood compartment, since a concurrent, similar pattern of inflammatory switch was observed in liver-infiltrating mononuclear cells. Thus, immune system disturbance in cirrhosis cannot be ascribed to a single compartment; rather it constitutes a proinflammatory polarisation response of the immune system. The inflammatory immune system plays a pivotal role in the pathogenesis of liver fibrosis and the haemodynamic derangement of cirrhosis.^{1 4 32 33} Since plasticity is a distinctive feature of the immune system,³⁴ we hypothesised that the severe alterations to circulating and liver-infiltrating mononuclear cells found in cirrhosis could be reversed by therapeutic immune modulation.

AM3 restores immune system homeostasis in chronic inflammatory conditions such as chronic pulmonary obstructive disease, with clinical improvement in the quality of life of the patients.^{18 21} AM3 also improves the immune response to hepatitis B vaccination in patients with immune deficiency secondary to chronic renal failure.¹⁷ Moreover, AM3 suppresses the overproduction of TNF α by LPS and modulates the TLR4-induced maturation of dendritic cells in experimental models.^{23 24 35} In our study, AM3 abrogated the intense inflammatory bias of the immune system response observed in

the peripheral blood and in the liver of cirrhotic rats. At the hepatic level, the diminished inflammatory cell response by AM3 led to decreased mRNA expression of the immunoregulatory cytokines, TGF β 1, IL4 and IFN γ and increased expression of IL10.

Of note, AM3 failed to produce any immune system effects in control rats, indicating that the biological response modifier selectively acts on already activated inflammatory immune system cells. Moreover, AM3 failed to interfere with the production of TNF α by activated T cells, which plays a key autocrine role in T cell activation and effector function.³⁶ Since TNF α depletion is associated with an augmented risk of infection, the absence of increased gut bacterial translocation in AM3-treated cirrhotic rats might be related to this preserved TNF α production by T cells. These findings reinforce the working notion that AM3 is not an immunosuppressive drug, but a safe biological response modifier in clinical settings of immunocompromise, such as advanced cirrhosis.

The immunomodulatory effect of AM3 with reduction on liver inflammation was associated with improved hepatic fibrosis, which highlights the tight relationship between inflammation and fibrosis. Indeed, monocyte lineage cells have been shown to promote hepatic fibrosis, are a potent source of the hepatic stellate cell activator TGF β 1, and can regulate the hepatic stellate cell response to platelet derived growth factor.^{37–40} The improvement in hepatic fibrosis, related here to a reduced number of activated mononuclear cells infiltrating the liver, underscores the role of immune system cells in liver fibrosis and their potential use as a therapeutic target.

Several studies have suggested a role of the proliferating cholangiocytes in the induction of liver fibrosis during acute and chronic cholestasis.^{41 42} Interestingly, AM3 reduced the number of bile ducts in the cirrhotic liver, and the serum activity of alkaline phosphatase. Such a result might suggest that the

antifibrotic effect of AM3 could be partly due to halting the expansion of bile-duct cells and of fibrogenic myofibroblasts, and points to a potential preferential action of AM3 on cholestatic liver damage.

Lowered portal pressure by AM3 was the consequence of reduction in hepatic fibrosis and in systemic hyperaemia. The improvement in the peripheral haemodynamic derangement observed in AM3-treated cirrhotic rats is in agreement with current experimental and clinical evidence that LPS-driven cytokine release in cirrhosis upregulates nitric oxide synthase, and that associated nitric oxide overproduction mediates peripheral arterial vasodilation.^{9 33} It is also in agreement with the demonstrated ability of AM3 to inhibit LPS-induced iNOS expression in mice.³⁵

The present findings provide proof of concept that the biological response modifier AM3 is capable of reversing inflammatory immune system activation at the hepatic and systemic level and of reducing hepatic fibrosis in experimentally established biliary cirrhosis. Future studies should clarify the mechanism of action of AM3 at the cell level and address its potential use in the design of novel immunomodulatory strategies for the treatment of cirrhosis.

Acknowledgements AM3 was kindly provided by Industrial Farmacéutica Cantabria, Madrid, Spain. We are indebted to Ana Burton for her assistance with the English translation. We are indebted to Laura García-Bermejo for scientific advice, and to María Teresa Muñoz Malo and Elena Juez for excellent technical assistance.

Funding MÚ is currently supported by a grant from the Spanish Ministry of Education (BES-2004-5534) and ML by a grant from la Junta de Comunidades de Castilla La Mancha (FPI 07/057). AA received grants from the Spanish Ministries of Education (no. BFU 2006-09280/BFI) and Health, Instituto de Salud Carlos III (no. EC08/00122), the Fundación Mutua Madrileña, and from the Spanish Ministry of Health, Instituto de Salud Carlos III (PI051871, Ciberehd). MÁ-M received grants from Comunidad de Madrid (MITIC-CM S-BIO-0189/2006) and from the Spanish Ministry of Health, Instituto de Salud Carlos III. Ciberhd is funded by the Instituto de Salud Carlos III.

Competing interests None.

Ethics approval Protocols involving animals were approved by the Ethics Committee for Research using Experimental Animals of the University of Alcalá in accordance with European legislation.

Provenance and peer review Not commissioned; externally peer reviewed.

REFERENCES

- Iredale JP. Models of liver fibrosis: exploring the dynamic nature of inflammation and repair in a solid organ. *J Clin Invest* 2007;**117**:539–48.
- Iredale JP. Regulating hepatic inflammation: pathogen-associated molecular patterns take their toll. *Hepatology* 2003;**37**:979–82.
- Tilg H, Wilmer A, Vogel W, et al. Serum levels of cytokines in chronic liver diseases. *Gastroenterology* 1992;**103**:264–74.
- Albillos A, de la Hera A, González M, et al. Increased lipopolysaccharide binding protein in cirrhotic patients with marked immune and hemodynamic derangement. *Hepatology* 2003;**37**:208–17.
- Albillos A, de la Hera A, Reyes E, et al. Tumour necrosis factor- α expression by activated monocytes and altered T-cell homeostasis in ascitic alcoholic cirrhosis: amelioration with norfloxacin. *J Hepatol* 2004;**40**:624–31.
- Muñoz L, Albillos A, Nieto M, et al. Mesenteric Th1 polarization and monocyte TNF- α production: first steps to systemic inflammation in rats with cirrhosis. *Hepatology* 2005;**42**:411–19.
- Kerfoot SM, D'Mello C, Nguyen H, et al. TNF- α -secreting monocytes are recruited into the brain of cholestatic mice. *Hepatology* 2006;**43**:154–62.
- Albillos A, Muñoz L, Nieto M, et al. Systemic effects of TNF- α secreted by circulating monocytes and fatigue in cirrhosis. *Hepatology* 2006;**43**:1399.
- Tazi KA, Moreau R, Hervé P, et al. Norfloxacin reduces aortic NO synthases and proinflammatory cytokine up-regulation in cirrhotic rats: role of Akt signaling. *Gastroenterology* 2005;**129**:303–14.
- Albillos A, de la Hera A, Álvarez-Mon M. Serum lipopolysaccharide-binding protein prediction of severe bacterial infection in cirrhotic patients with ascites. *Lancet* 2004;**363**:1608–10.
- Chin-Dusting JP, Rasaratnam B, Jennings GL, et al. Effect of fluoroquinolone on the enhanced nitric oxide-induced peripheral vasodilation seen in cirrhosis. *Ann Intern Med* 1997;**127**:985–8.
- Muñoz J, Albillos A, Pérez-Páramo M, et al. Factors mediating the hemodynamic effects of tumor necrosis factor- α in portal hypertensive rats. *Am J Physiol* 1999;**276**:G687–93.
- López-Talavera JC, Merrill WW, Groszmann RJ. Tumor necrosis factor α : a major contributor to the hyperdynamic circulation in prehepatic portal-hypertensive rats. *Gastroenterology* 1995;**108**:761–7.
- Eigler A, Matschke V, Hartmann G, et al. Suppression of TNF- α production in human mononuclear cells by an adenosine kinase inhibitor. *J Leukoc Biol* 2000;**68**:97–103.
- Jørgensen KA, Koefoed-Nielsen PB, Karamperis N. Calcineurin phosphatase activity and immunosuppression. A review on the role of calcineurin phosphatase activity and the immunosuppressive effect of cyclosporin A and tacrolimus. *Scand J Immunol* 2003;**57**:93–8.
- Naveau S, Chollet-Martin S, Dharancy S, et al. A double-blind randomized controlled trial of infliximab associated with prednisolone in acute alcoholic hepatitis. *Hepatology* 2004;**39**:1390–7.
- Pérez-García R, Pérez-García A, Verbeelen D, et al. AM3 (Immunoféron) as an adjuvant to hepatitis B vaccination in hemodialysis patients. *Kidney Int* 2002;**61**:1845–52.
- Álvarez-Mon M, Miravittles M, Morera J, et al. Treatment with the immunomodulator AM3 improves the health-related quality of life of patients with COPD. *Chest* 2005;**127**:1212–18.
- Varela J, Navarro Pico ML, Guerrero A, et al. Identification and characterization of the peptidic component of the immunomodulatory glycoconjugate Immunoféron. *Methods Find Exp Clin Pharmacol* 2002;**24**:471–80.
- Sidwell RW, Huffman JH, Barnard DL, et al. Antiviral and immunomodulating inhibitors of experimentally-induced Punta Toro virus infections. *Antiviral Res* 1994;**25**:105–22.
- Reyes E, Prieto A, de la Hera A, et al. Treatment with AM3 restores defective T-cell function in COPD patients. *Chest* 2006;**129**:527–35.
- Prieto A, Reyes E, Bernstein ED, et al. Defective natural killer and phagocytic activities in chronic obstructive pulmonary disease are restored by glycoprophosphopeptid (immunoféron). *Am J Respir Crit Care Med* 2001;**163**:1578–83.
- Martín-Vilchez S, Molina-Jiménez F, Alonso-Lebrero JL, et al. AM3, a natural glycoconjugate, induces the functional maturation of human dendritic cells. *Br J Pharmacol* 2008;**154**:698–708.
- Brieva A, Guerrero A, Alonso-Lebrero JL, et al. Immunoféron, a glycoconjugate of natural origin, inhibits LPS-induced TNF- α production and inflammatory responses. *Int Immunopharmacol* 2001;**1**:1979–87.
- Brieva A, Guerrero A, Pivel JP. Immunoféron, a glycoconjugate of natural origin, regulates the liver response to inflammation and inhibits TNF- α production by an HPA axis-dependent mechanism. *Int Immunopharmacol* 2002;**2**:807–13.
- Crispe IN. Isolation of mouse intrahepatic lymphocytes. *Curr Protoc Immunol* 2001; Chapter 3:Unit 3.21:3.21.1–3.21.8.
- Hogan MM, Vogel SN. Measurement of tumor necrosis factor α and β . *Curr Protoc Immunol* 2001;Chapter 6:Unit 6.10.
- Ruwart MJ, Wilkinson KF, Rush BD, et al. The integrated value of serum procollagen III peptide over time predicts hepatic hydroxyproline content and stainable collagen in a model of dietary cirrhosis in the rat. *Hepatology* 1989;**10**:801–6.
- Ebrahimkhani MR, Kiani S, Oakley F, et al. Naltrexone, an opioid receptor antagonist, attenuates liver fibrosis in bile duct ligated rats. *Gut* 2006;**55**:1606–16.
- Battaller R, Schwabe RF, Choi YH, et al. NADPH oxidase signal transduces angiotensin II in hepatic stellate cells and is critical in hepatic fibrosis. *J Clin Invest* 2003;**112**:1383–94.
- Sancho-Bru P, Battaller R, Fernandez-Varo G, et al. Bradykinin attenuates hepatocellular damage and fibrosis in rats with chronic liver injury. *Gastroenterology* 2007;**133**:2019–28.
- Battaller R, Brenner DA. Liver fibrosis. *J Clin Invest* 2005;**115**:209–18.
- Wiest R, Das S, Cadelina G, et al. Bacterial translocation in cirrhotic rats stimulates eNOS-derived NO production and impairs mesenteric vascular contractility. *J Clin Invest* 1999;**104**:1223–33.
- Mora JR, von Andrian UH. T-cell homing specificity and plasticity: new concepts and future challenges. *Trends Immunol* 2006;**27**:235–43.
- Majano P, Alonso-Lebrero JL, Janczyk A, et al. AM3 inhibits LPS-induced iNOS expression in mice. *Int Immunopharmacol* 2005;**5**:1165–70.
- Aggarwal BB, Samanta A, Feldmann M. TNF- α . In: Oppenheim JJ, Feldmann M, eds. *Cytokine reference. A compendium of cytokines and other mediators of host defense*. Academic Press: New York: 2000:413.
- Matsuoka M, Tsukamoto H. Stimulation of hepatic lipocyte collagen production by Kupffer cell-derived transforming growth factor β : implication for a pathogenetic role in alcoholic liver fibrogenesis. *Hepatology* 1990;**11**:599–605.
- Friedman SL, Arthur MJ. Activation of cultured rat hepatic lipocytes by Kupffer cell conditioned medium. Direct enhancement of matrix synthesis and stimulation of cell proliferation via induction of platelet-derived growth factor receptors. *J Clin Invest* 1989;**84**:1780–5.

39. **Imamura M**, Ogawa T, Sasaguri Y, *et al*. Suppression of macrophage infiltration inhibits activation of hepatic stellate cells and liver fibrogenesis in rats. *Gastroenterology* 2005;**128**:138–46.
40. **Duffield JS**, Forbes SJ, Constantinou CM, *et al*. Selective depletion of macrophages reveals distinct, opposing roles during liver injury and repair. *J Clin Invest* 2005;**115**:56–65.
41. **Kinnman N**, Francoz C, Barbu V, *et al*. The myofibroblastic conversion of peribiliary fibrogenic cells distinct from hepatic stellate cells is stimulated by platelet-derived growth factor during liver fibrogenesis. *Lab Invest* 2003;**83**:163–73.
42. **Díaz R**, Kim JW, Hui JJ, *et al*. Evidence for the epithelial to mesenchymal transition in biliary atresia fibrosis. *Hum Pathol* 2008;**39**:102–15.

Editor's quiz: GI snapshot

ANSWER

From the question on page 933

The CT scan shows a target-shaped lesion representing a small bowel intussusception (seen characteristically as a target or sausage-shaped lesion depending on the angle of the CT beam) below the level of the lower pole of the left kidney with associated mesenteric lymphadenopathy. The 'target' represents intussuscepted bowel within bowel, with associated mesenteric fat seen as a low attenuation rim. At laparotomy the intussusception had resolved but there were several small bowel mesenteric lymph nodes adjacent to an area of inflammation in the mid-jejunum. Enterotomy revealed a punched-out ulcer which was resected (see figure 1). Histological examination of the specimen showed villous atrophy and increased intra-epithelial lymphocytes in keeping with coeliac disease (CD). In addition highly atypical T cells were seen within the ulcer base, and subsequent immunophenotyping confirmed the diagnosis of enteropathy-associated T cell lymphoma (EATL). He subsequently underwent CHOP chemotherapy.

Intussusception of the small intestine, whilst common and usually benign in children, is rare in adults and usually associated with significant pathology including malignant lesions. It is also increasingly recognised as a transient, silent phenomenon in association with CD in both adults and children,¹ with imaging studies of treated patients showing an incidence of up to 20%.²

Whilst intussusception can be a benign self-limiting entity in CD, when associated with significant symptoms surgical exploration should be considered to exclude malignancy. Indeed a recent study suggests a higher incidence of intussusception and other CT abnormalities in those with EATL and refractory CD.³ Although rare, EATL should be considered as a cause for intussusception in patients with CD.

EATL is strongly associated with CD, with a peak incidence in the sixth decade of life. Symptoms include abdominal pain, anorexia, diarrhoea and weight loss. EATL can occur at the time of presentation of CD, as a cause of relapse or in refractory CD.



Figure 1 Resected jejunal specimen containing a 1 cm longitudinal ulcer.

Prognosis is poor despite chemotherapy, with reported survival of only 28% at 2 years.⁴

Gut 2010;**59**:952. doi:10.1136/gut.2009.185025a

REFERENCES

1. **Strobl PW**, Warshauer DM. CT diagnosis of coeliac disease. *J Comput Assist Tomogr* 1995;**19**:319–20.
2. **Tomei E**, Diacinti D, Marini M, *et al*. Abdominal CT findings may suggest coeliac disease. *Dig Liver Dis* 2005;**37**:402–6.
3. **Mallant M**, Hadithi M, Al-Toma AB, *et al*. Abdominal computed tomography in refractory coeliac disease and enteropathy associated T-cell lymphoma. *World J Gastroenterol* 2007;**13**:1696–700.
4. **Hönemann D**, Prince HM, Hicks RJ, *et al*. Enteropathy-associated T-cell lymphoma without a prior diagnosis of coeliac disease: diagnostic dilemmas and management options. *Ann Hematol* 2005;**84**:118–21.

Critical Role of the Liver in the Induction of Systemic Inflammation in Rats with Compensated Cirrhosis

María Úbeda,^{1,2} Leticia Muñoz,^{1,2} María-José Borrero,^{1,2} David Díaz,^{1,2} Rubén Francés,^{2,4} Jorge Monserrat,^{1,2} Margaret Lario,^{1,2} Lourdes Lledó,³ José Such,^{2,4} Melchor Álvarez-Mon,^{1,2,5*} and Agustín Albillos^{1,2,6*}

AQ5

AQ6

Systemic activation of the inflammatory immune system contributes to the progression of cirrhosis with ascites. Immune cells become activated after interacting at the mesenteric lymph nodes (MLNs) with bacteria translocated from the gut, and thereafter reach the bloodstream through recirculation. It is unknown whether systemic activation of the immune system is present in compensated (pre-ascitic) cirrhosis, in which gut bacterial translocation has not been described. The purpose of this study was to determine whether systemic activation of the immune system initiates in rats with compensated carbon tetrachloride (CCl₄)-induced cirrhosis, and if so to establish the activation site of immune cells. We studied the activation status of immune cells in peripheral blood, MLNs, and hepatic lymph nodes (HLNs). Systemic inflammation was present in rats with cirrhosis, as shown by expansion ($P < 0.01$) of circulating total and inflammatory monocytes and recently activated CD134⁺ T helper (T_h) cells. The same populations of cells were increased ($P < 0.01$) in MLNs and HLNs. Bacterial translocation was absent in rats with cirrhosis or control rats, but bacterial DNA fragments were present in the MLNs of 54% of rats with cirrhosis. The liver was the source of activated immune cells present in the blood, as shown by the direct correlation between activated T_h cells in the blood and HLNs, but not in MLNs, and the normalization by gut decontamination with antibiotics of activated cells in MLNs, but not in the blood or HLNs. **Conclusion:** In experimental cirrhosis, systemic activation of the immune system occurs before ascites development and is driven by recirculation of cells activated in HLNs. In addition, in compensated cirrhosis, bacterial DNA fragments reach the MLNs, where they elicit a local inflammatory response. (HEPATOLOGY 2010;00:000-000)

The immune system is a complex network of cells and molecules that plays a relevant role in the defense against infections through its ability to recognize and develop a response against non-self-antigens.¹ The effector defensive response is associated with the induction of an orchestrated cascade of events that involve activation of immune system cells and production of cytokines at the systemic and/or local level. Although the inflammatory response is essential for maintaining tissue homeostasis, protecting against

Abbreviations: APC, allophycocyanin; CCl₄, carbon tetrachloride; FITC, fluorescein isothiocyanate; HLN, hepatic lymph node; IL-6, interleukin-6; MLN, mesenteric lymph node; PE, phycoerythrin; PerCP, peridinin chlorophyll protein; T_h, T helper; TNF α , tumor necrosis factor α .

From the ¹Laboratorio de Enfermedades del Sistema Inmune, Departamento de Medicina, and ²Departamento de Microbiología, Universidad de Alcalá, Alcalá de Henares, Spain; ³Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Hepáticas y Digestivas (Ciberehd), Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain; ⁴Servicio de Gastroenterología, Hospital General Universitario de Alicante, Alicante, Spain; ⁵Servicio de Enfermedades del Sistema Inmune y Oncología, Hospital Universitario Príncipe de Asturias, Instituto de Medicina Molecular IMMPA, Alcalá de Henares, Spain; and ⁶Servicio de Gastroenterología y Hepatología, Hospital Universitario

AQ1 Ramón y Cajal, Madrid, Spain.

Received February 21, 2010; accepted August 30, 2010.

M. Ú. was received a grant from the Spanish Ministry of Education (BES-2004-5534). M. L. received a grant from la Junta de Comunidades de Castilla La Mancha (FPI 07/057). M. J. B. received a grant from the Spanish Ministry of Education (BES-2008-003209). A. A. received grants from the Spanish Ministries of Education (BFU 2006-09280/BFI) and Health, Instituto de Salud Carlos III (no. PS09/00485), the Fundación Mutua Madrileña, and the Spanish Ministry of Health, Instituto de Salud Carlos III (PI051871, Ciberehd). M. Á.-M. received grants from Comunidad de Madrid (MITIC-CM S-BIO-0189/2006) and from the Spanish Ministry of Health, Instituto de Salud Carlos III. Ciberehd is funded by the Instituto de Salud Carlos III

AQ2 AQ3 *These authors contributed equally.

Address reprint requests to: Agustín Albillos, Departamento de Medicina, Facultad de Medicina-Campus Universitario, Universidad de Alcalá, Carretera Madrid-Barcelona km. 33.600, 28871 Alcalá de Henares, Madrid, Spain. E-mail: aalbillosm@meditex.es; fax: (34)-918854526.

Copyright © 2010 by the American Association for the Study of Liver Diseases.

View this article online at wileyonlinelibrary.com.

DOI 10.1002/hep.23961

Potential conflict of interest: Nothing to report.

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article.

infection, and mediating immune responses, it can also contribute to tissue injury.²

The immune system is abnormally activated at the systemic level in patients and experimental models with cirrhosis and ascites.³⁻⁵ The alteration is characterized by expansion of activated lymphocytes and monocytes in peripheral blood and an increased production of proinflammatory cytokines.³⁻⁵ It has been claimed that in cirrhosis with ascites, this systemic inflammatory response is mainly induced and maintained by the interaction of cells of the immune system with bacteria that have translocated from the intestinal lumen at the mesenteric lymph nodes (MLNs). Thereafter, recirculation of activated immune cells extends the inflammation response to the peripheral blood.⁵⁻⁷ Activated immune cells can migrate to the tissues and modify the function of somatic cells, such as vascular endothelial and brain cells, and contribute to the nonhepatic clinical expression of cirrhosis.^{3,8-10}

Despite the pivotal role of systemic activation of the immune system in cirrhosis, it is unknown whether this abnormality already exists in the compensated preascitic stage of the disease. It is possible to hypothesize that the liver, the main organ of inflammation in cirrhosis, has a crucial role as a source of abnormally activated monocytes and lymphocytes. Such a particular role of the liver appears to be particularly relevant in rats with cirrhosis but without ascites, in which gut bacterial translocation is not increased.¹¹ The aim of this study was to investigate whether there is in fact systemic activation of the inflammatory immune system in rats with compensated carbon tetrachloride (CCl₄)-induced cirrhosis, and if so to establish the pivotal site where immune system cells become activated.

Materials and Methods

Animals

Male Wistar rats (Harlan, Horst, The Netherlands) were used for all experiments. Animals were fed a standard laboratory diet with water and food provided ad libitum. All experiments were approved by the Spanish animal welfare authorities and performed in accordance with the animal care guidelines of our institution. All studies were conducted according to the *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals* (NIH publication 86-23, revised 1985) and in compliance with local regulations.

Induction of Cirrhosis

Cirrhosis was induced by CCl₄ feeding by gavage on a weekly basis, along with phenobarbital added to

the drinking water. The initial 20- μ L dose of CCl₄ was subsequently increased, depending on the animal's weekly change in body weight. Animals were sacrificed at 12 weeks, when cirrhosis without ascites is almost constantly present.¹² Experiments were performed 7 days after the last CCl₄ dose. Cirrhosis was confirmed by way of trichrome staining of livers.

Instrumentation

Experiments were performed in 8-hour fasted animals under sterile conditions. Anesthesia was induced with isoflurane (Forane; Abbott Laboratories, Madrid, Spain). The abdomen was opened, and 5-10 mL of peripheral blood was obtained by way of aortic puncture. After blood collection, the lymph nodes of the ileocecal area (MLNs) and hepatic hilum (hepatic lymph nodes [HLNs]) were aseptically removed. Thereafter, the liver was perfused through the portal vein with a prewarmed digestion buffer, cut into small pieces, and enzymatically digested as described.^{13,14}

Study Design

The phenotype and activation status of lymphocyte and monocyte subpopulations in the different immune system compartments (MLNs, HLNs, liver, and peripheral blood) were examined in rats with cirrhosis without ascites ($n = 28$) and in healthy, phenobarbital-treated age- and sex-matched rats ($n = 20$). A subgroup of rats with cirrhosis but without ascites ($n = 14$) received a 2-week course of broad-spectrum oral nonabsorbable antibiotics (norfloxacin 10 mg/kg/day and vancomycin 16 mg/day; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) or placebo to investigate the impact of enteric bacterial products on immune cells. Finally, we examined the phenotype and activation status of immune cell subpopulations in rats receiving the first three doses of CCl₄ ($n = 5$) or only phenobarbital in drinking water ($n = 5$).

Methods

Peripheral blood mononuclear cells were separated by way of Histopaque-1083 (Sigma-Aldrich) density gradient centrifugation. Single mononuclear cell suspensions from MLNs and HLNs were obtained by pressing the nodes through a 150- μ m pore mesh (Sefar Maissa SA, Madrid, Spain) and from the liver by a modification of the method of Crispe.^{13,14} Briefly, perfused livers were digested with media containing collagenases (type I, Invitrogen, Grand Island, NY; type IV, Sigma-Aldrich) and DNase I (Roche, Mannheim, Germany). The resultant cell suspension was passed

Table 1. Definition Criteria for the Immune Cell Populations Examined

Immune Cell Subsets	Function Associated with the Indicated Surface Receptors
T cells	
CD3	Signal transduction module in the T cell receptor for antigen (TCR/CD3 complex); expressed in all T cell subsets
CD4	TCR/CD3 coreceptor that recognizes MHC class II molecules, which present antigens to Th cells; Th cell marker
CD8	TCR/CD3 coreceptor that recognizes class I MHC molecules, which present antigens to Tc cells; identifies Tc cell marker
CD62L	Member of the selectin adhesion molecule family that is required for lymphocyte homing to peripheral lymph nodes and is rapidly shed from lymphocytes upon activation; the level of CD62L expression distinguishes naive from effector T cells
CD134	Also termed OX-40 receptor; a costimulatory molecule that identifies a subpopulation of recently activated Th cells
B cells	
CD45RA	Isoform of the leukocyte common antigen that identifies B cells
CD80	One of the accessory molecules that play an important role in T cell-B cell costimulatory interactions
Monocytes	
CD11b ^{bright}	Integrin expressed on the surface of monocyte lineages
NK-RP1A ^{med}	NKR-P1A has been detected at low levels on peripheral blood monocytes, and its expression is up-regulated specifically in a subpopulation of large monocytes with phagocytic capacity
CD43	Rat monocytes can also be divided into CD43 ^{low} and CD43 ^{high} subsets with distinct migratory properties in vivo; expression is down-regulated in inflammatory monocytes
Dendritic cells	
OX-62	Rat α_{E2} integrin expressed by myeloid dendritic cells and a subset of T cells
RT1B	Class II MHC: responsible for antigen presentation to CD4 ⁺ Th cells; expressed on the surface of dendritic cells

Abbreviation: MHC, major histocompatibility complex.

through a stainless mesh and centrifuged to obtain a cell pellet depleted of hepatocytes.

Surface Immunofluorescence and Quantitative Flow Cytometry. Proportions of monocyte, B cell, and T cell subpopulations were determined in cell suspensions obtained from peripheral blood, MLNs, HLN, and liver by way of four-color immunofluorescence and flow cytometry in a FACScalibur cytometer using Cell Quest software (Becton-Dickinson, San Jose, CA). Analyses were performed using FlowJo software (Tree Star, San Carlos, CA). Cell suspensions were incubated with combinations of fluorescein isothiocyanate (FITC)-, phycoerythrin (PE)-, peridinin chlorophyll protein (PerCP)-, allophycocyanin (APC)-, and AlexaFluor647-labeled T1 monoclonal antibodies (Table 1). The rat monoclonal antibodies (BD Pharmingen, San Diego, CA, and Serotec, Kidlington, Oxford, UK) used were: APC-CD3 (1F4), PE-Cy5.5-CD4 (OX-38), PerCP-CD8a (OX8), FITC-CD134 (OX 40), PE-CD62L (HRL1), Alexa-Fluor647-CD11b (OX-42), PE-NKR-P1A (10/78), FITC-CD43 (W3/13), FITC-CD45RA (OX 33), PerCP-RT1B (OX 6), PE-OX62 (MRC OX-62), and PE-CD80 (3H5). Immune cell numbers in lymph nodes, liver, and blood were counted in a Neubauer chamber. Absolute cell counts of mononuclear cell subpopulations (cells/node $\times 10^{-3}$, cells/liver $\times 10^{-3}$ and cells/ μ L of blood) were calculated by multiplying the absolute number by the proportion of each subpopulation established by flow cytometry.

Bacteriological Study. Samples of MLN were inoculated in thioglycollate (Scharlab, Barcelona, Spain) and incubated at 37°C for 48 hours. Specific microorgan-

isms were identified by a manual biochemical test or automated system (Microscan; Baxter, Irvine, CA). Bacterial translocation from the intestinal lumen was defined as the presence of viable organisms (i.e., a positive bacteriological culture result from the MLNs).^{8,15,16}

DNA Isolation, Amplification, and Sequencing. MLNs were homogenized in PBS by way of sonication (UP100H Ultrasonic Processor, Hielscher, Teltow, Germany). Genomic DNA from homogenized MLNs was isolated using the QIAmp Tissue Kit (Qia-gen, Hilden, Germany). Bacterial DNA was identified by running a broad-range polymerase chain reaction followed by nucleotide sequencing of a conserved region of the 16SrRNA gene.¹⁷

Inflammatory Markers in MLN and Serum, and Aminotransferases in Serum. Serum samples and homogenized MLNs were stored at -80°C until analysis. Enzyme-linked immunosorbent assay kits (Biosource International, CA, and R&D Systems, Minneapolis, MN) were used to determine tumor necrosis factor α (TNF α) and interleukin-6 (IL-6) according to the manufacturers' instructions. The sensitivity detection limits were 5 pg/mL and 8 pg/mL, respectively. All experiments were performed in duplicate. Serum concentrations of aspartate aminotransferase and alanine aminotransferase were determined using an automatic analyzer (Beckman Coulter, Villepinte, France).

Statistical Analysis

Results are presented as the mean \pm SD. Quantitative variables were analyzed using a Fisher's exact test and an unpaired Student *t* test. Correlations between

Table 2. Immunophenotypic Profile of T and B Lymphocytes and Monocytes in Peripheral Blood, MLNs, and HLNs in Rats with Cirrhosis but not Ascites

Immune Cell Subsets	Peripheral Blood (cells/ μ L)		MLNs (cells/node $\times 10^{-3}$)		HLNs (cells/node $\times 10^{-3}$)	
	Rats with Cirrhosis but not Ascites (n = 28)	Control Rats (n = 20)	Rats with Cirrhosis but not Ascites (n = 28)	Control Rats (n = 20)	Rats with Cirrhosis but not Ascites (n = 28)	Control Rats (n = 20)
T cells (CD3 ⁺)	1,243 \pm 554	1,087 \pm 522	7,222 \pm 3,199†	5,208 \pm 2,890	2,583 \pm 1,340*	1,495 \pm 799
Total T _h (CD4 ⁺ CD8 ⁻)	896 \pm 397	761 \pm 359	4,724 \pm 2,875	3,768 \pm 1,968	2,098 \pm 1,088†	1,077 \pm 666
Recently activated T _h (CD134 ⁺)	89 \pm 49*	17 \pm 11	458 \pm 252*	254 \pm 160	319 \pm 114*	68 \pm 37
Effector T _h (CD62L ⁻)	106 \pm 60‡	66 \pm 41	1387 \pm 663*	809 \pm 253	987 \pm 473*	228 \pm 102
Total T _c (CD4 ⁻ CD8 ⁺)	307 \pm 170	293 \pm 164	1344 \pm 805	1328 \pm 801	407 \pm 249	390 \pm 127
Effector T _c (CD62L ⁻)	38 \pm 25	32 \pm 20	190 \pm 73	143 \pm 68	53 \pm 35	34 \pm 22
B cells (CD45RA ⁺)	871 \pm 385†	580 \pm 345	5,589 \pm 2,362*	3,214 \pm 1,657	1,449 \pm 672†	699 \pm 308
Activated B cells (CD80 ⁺)	24 \pm 19‡	10 \pm 7	132 \pm 70†	50 \pm 60	73 \pm 53†	19 \pm 18
Monocytes (CD3 ⁻ CD45RA ⁻ NK-RP1A ^{high} -CD11b ^{bright} +))	491 \pm 202*	126 \pm 70	54 \pm 42‡	17 \pm 11	38 \pm 28†	6 \pm 4
Inflammatory monocytes (CD43 ⁻ NK-RP1A ^{med} +))	88 \pm 55*	30 \pm 17	38 \pm 15‡	8 \pm 5	18 \pm 14†	3 \pm 2
Dendritic cells (CD3 ⁻ CD45RA ⁻ OX62 ⁺ RT1B ^{bright} +))	11 \pm 9‡	5 \pm 3	88 \pm 69‡	38 \pm 27	63 \pm 43†	12 \pm 11

Abbreviation: T_c, T cytotoxic.* $P < 0.001$ versus control rats.† $P < 0.01$ versus control rats.‡ $P < 0.05$ versus control rats.

selected variables were assessed by way of linear regression analysis. The level of statistical significance was set at $P < 0.05$.

Results

Seventeen out of 45 animals (38%) died during cirrhosis induction. On the day of the experiment, cirrhosis was present in all the animals on CCl₄, as shown by histological assessment of the livers (data not shown), and the peritoneal cavity was free of ascites. The rats with cirrhosis showed higher serum aminotransferase levels ($P < 0.01$) than controls (aspartate aminotransferase, 162 \pm 71 versus 64 \pm 21 IU/L; alanine aminotransferase, 51 \pm 14 versus 21 \pm 2 IU/L).

Expansion of Activated T Helper Cells and Monocytes and Rise in Proinflammatory Cytokine Concentrations in the Peripheral Blood of Rats with Cirrhosis but not Ascites. We first examined the presence of systemic immune system disturbance in rats with compensated cirrhosis. Compared with controls, there was marked expansion of activated T helper (T_h) cells, B cells, and monocytes in the peripheral blood of rats with cirrhosis (Table 2). Expansion of activated T_h cells was indicated by a 5.2-fold increase ($P < 0.001$) in the subset of T_h cells expressing the costimulatory receptor CD134, a marker of recent activation, and by a 1.6-fold increase ($P < 0.01$) in the subset of effector T_h cells, identified as those that have lost the selectin adhesion molecule CD62L.¹⁸ The CD11b^{bright} monocyte population was also markedly expanded and

showed signs of activation, including a 2.9-fold increase ($P < 0.001$) in the number of inflammatory monocytes,¹⁹ which are those with phagocytic activity and the ability to migrate to inflamed tissues.^{20,21} Other antigen-presenting cells (such as dendritic cells) were also expanded (2.2-fold) in the peripheral blood of rats with cirrhosis. In agreement with the increased number of activated T_h cells and monocytes, levels of proinflammatory cytokines were significantly higher in the circulation of rats with cirrhosis (TNF α , 9.4 \pm 0.6 versus 8.9 \pm 0.2 pg/mL [$P < 0.05$]; IL-6, 58.2 \pm 1.2 versus 50.6 \pm 2.8 pg/mL, $P < 0.05$).

T_h Cells and Monocytes Become Activated in HLNs of Rats with Cirrhosis. The number of intrahepatic T_h cells increased by 1.4-fold (4,667 \pm 2,481 versus 3,281 \pm 1,107 cells/liver $\times 10^{-3}$ [$P < 0.05$]) and that of T_h cells expressing the CD134 receptor by 4.8-fold in rats with cirrhosis compared with controls (785 \pm 411 versus 163 \pm 101 cells/liver $\times 10^{-3}$ [$P < 0.01$]). The latter finding was concurrent with expansion of the total number of activated effector (CD62L⁻) T_h cells (4,910 \pm 3,340 versus 1,450 \pm 401 cells/liver $\times 10^{-3}$ [$P < 0.05$]). As expected,²² the livers of rats with cirrhosis showed a significantly lower number of natural killer cells compared with controls (3,097 \pm 2,002 versus 5,433 \pm 2,679 cells/liver $\times 10^{-3}$ [$P < 0.01$]), but there were no signs of activation of other immune cell populations, such as B cells expressing the CD80⁺ receptor, or monocyte/macrophages.

It has been established that there is an intense immune system cell trafficking between the liver and its

Table 3. Results of Bacterial DNA Detection and Species Identification Through Nucleotide Sequencing in MLNs of Rats

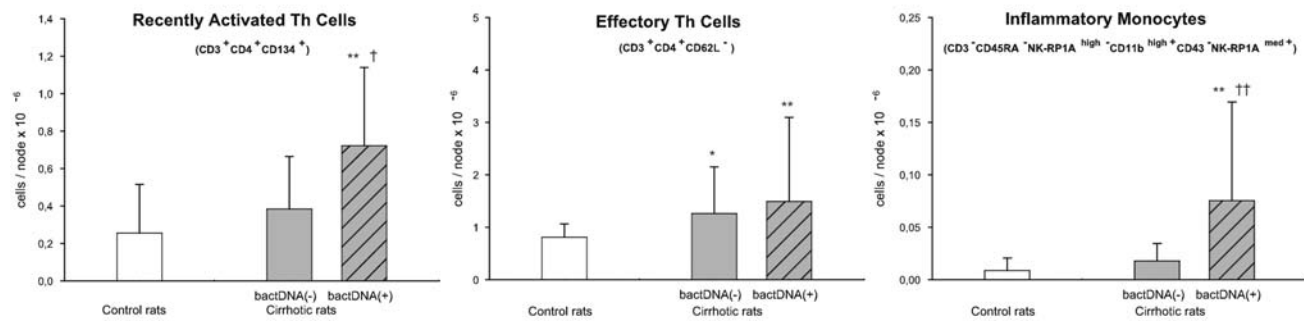
Study Group	MLNs
Rats with cirrhosis	
n = 11	<i>Escherichia coli</i>
n = 3	<i>Pseudomonas</i> spp.
n = 1	<i>Klebsiella</i>
n = 13	Negative
Control rats	
n = 20	Negative

draining lymph nodes (the HLNs), which are located along the hepatic artery as far as the portal vein.^{23,24} The HLNs of rats with cirrhosis showed marked enlargement (27 ± 12 versus 13 ± 6 mg [$P < 0.05$]), likely because of the significant expansion of T cells (1.7-fold), B cells (2.1-fold), and monocytes (6.3-fold). Activation of HLN T_h cells was shown by significantly increased ($P < 0.001$) numbers of recently activated CD134⁺ T_h cells, as well as of those that had lost the selectin adhesion molecule CD62L. The number of inflammatory monocytes was higher by six-fold in the HLNs of rats with cirrhosis (Table 2).

Bacterial DNA Fragments in MLNs of Rats with Cirrhosis but not Ascites Start a Local Immune Response in the Absence of Microbiological Evidences of Bacterial Translocation. We have noted that an orchestrated immune response cascade initiated by enteric bacteria in MLNs contributes to the systemic inflammation of experimental cirrhosis with ascites.⁵ However, gut bacterial translocation, although apparent in rats with cirrhosis and ascites,^{11,16} is distinctively absent in rats without ascites.¹¹ As in the HLNs, the MLNs of rats with cirrhosis showed significant ($P < 0.05$) simultaneous expansion of T cells (1.4-fold), B cells (1.7-fold), and monocytes (3.2-fold), accounting for an increased lymph node weight (24 ± 12 versus 15 ± 7 mg [$P < 0.05$]). Indeed, the subpopulations of recently activated CD134⁺ and CD62L[−] T_h cells were expanded ($P < 0.001$), as were the numbers of B cells expressing the CD80⁺ receptor and monocytes expressing the activation marker NKR-P1A (Table 2). Of note, we also observed the marked expansion of dendritic cells (by 2.3-fold [$P < 0.05$]) in the MLNs of rats with cirrhosis.

Thereafter, we explored the contribution of enteric bacteria to the activation of MLNs and circulating

A. Mesenteric lymph node



B. Peripheral blood

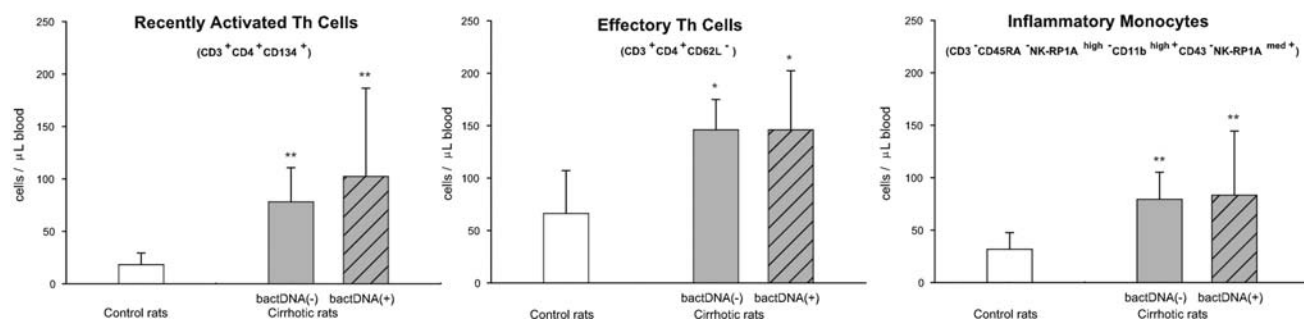


Fig. 1. Immunophenotypic profile of T_h cells and monocytes in the (A) MLNs and (B) peripheral blood of control rats and rats with cirrhosis with (+) or without (−) bacterial DNA fragments (bactDNA) in the MLNs. * $P < 0.05$ versus control rats. ** $P < 0.01$ versus control rats. † $P < 0.05$ versus bactDNA (−) rats with cirrhosis. †† $P < 0.01$ versus bactDNA (−) rats with cirrhosis.

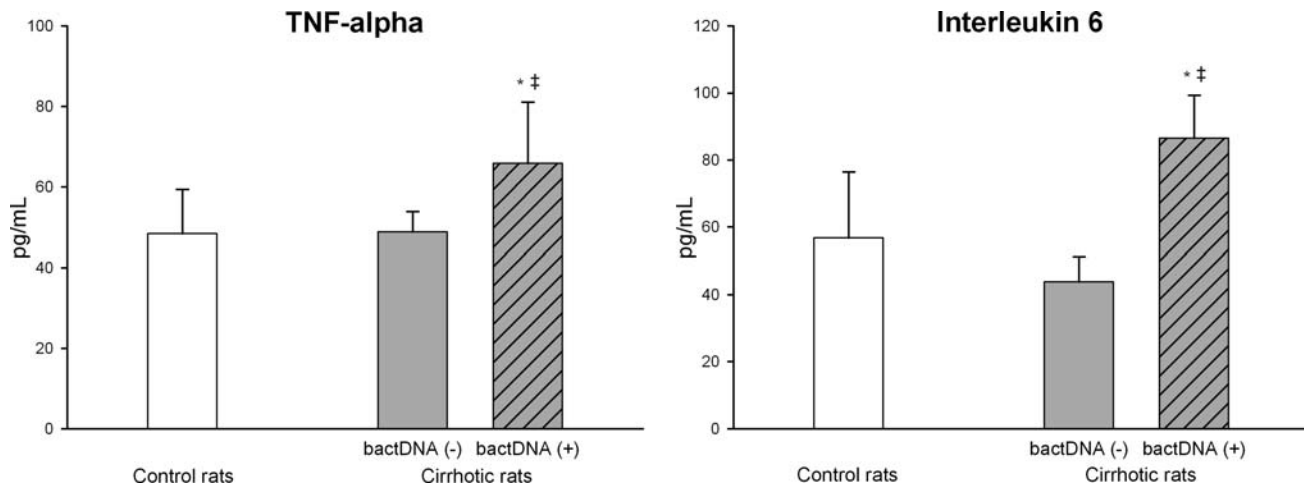


Fig. 2. Levels of TNF α and IL-6 in the MLNs of control rats and rats with cirrhosis with (+) or without (-) bacterial DNA fragments (bactDNA) in the MLNs. * $P < 0.05$ versus control rats. ** $P < 0.01$ versus control rats. † $P < 0.05$ versus bactDNA (-) rats with cirrhosis. †† $P < 0.01$ versus bactDNA (-) rats with cirrhosis.

immune system cells. Although no episodes of bacterial translocation were detected in rats with cirrhosis or control rats (culture-negative MLNs), bacterial DNA was demonstrated in the MLNs of 15 of the 28 rats with cirrhosis (53.6%) (Table 3) and in no control animals ($P < 0.01$). As illustrated in Fig. 1, there is a close association between the immune system alteration observed in the MLNs of rats with cirrhosis and the presence of bacterial DNA fragments. Indeed, the numbers of activated T_h cells, B cells, and monocytes in the MLNs of rats with cirrhosis without bacterial CpG motifs were similar to those observed in control rats. Accordingly, levels of the proinflammatory cytokines TNF α and IL-6 were only elevated in the MLNs of rats with cirrhosis and bacterial DNA (Fig. 2).

HLNs Are the Main Source of Activated Immune Cells Contributing to Systemic Inflammation in Rats with Cirrhosis. We went on to examine the relative contributions of liver/HLN and/or enteric bacterial driven-mesenteric inflammation to the activated immune system cells observed in the circulation of rats with cirrhosis. To this end, we analyzed the activation status of immune cells in peripheral blood according to the presence of bacterial DNA in MLNs and in response to bowel decontamination with nonabsorbable antibiotics, as well as correlations among activated immune cells in the compartments studied. As shown in Fig. 1, the numbers of total and activated T_h cells and monocytes in the peripheral blood of rats with cirrhosis without bacterial DNA in MLNs were significantly greater than in control animals, but similar to those observed in rats with cirrhosis with bacterial DNA.

Bowel decontamination normalized the number and activation state of immune cells in the MLN, but did

not affect immune cell subpopulations in peripheral blood or HLN (Table 4). We did not detect fragments of bacterial DNA in the MLNs of any of the antibiotic-treated rats with cirrhosis. Indeed, the broad-spectrum nonabsorbable antibiotics abrogated the expansion of recently activated CD134⁺ and CD62L⁻ T_h cells, inflammatory monocytes, and dendritic cells in the MLNs of rats with cirrhosis, whose values were no longer significantly different from those found in control animals. In contrast, antibiotics lacked any significant effects on the distribution and activation status of immune cells in the HLNs and peripheral blood of rats with cirrhosis (Table 4).

Notably, we observed direct correlation between the percentage of recently activated T_h cells ($r = 0.59$, $P < 0.01$) and inflammatory monocytes ($r = 0.64$, $P < 0.01$) found in the blood and HLNs of individual rats with cirrhosis (Fig. 3), further supporting the role of HLNs as a source of activated immune cells that recirculate toward peripheral blood.

Absence of Inflammation in Peripheral Blood or in MLNs of Rats on a Short Course of CCl₄. We also investigated the effect of a short-course of CCl₄ on the immune cells of the MLNs, HLNs, and peripheral blood of rats before chronic liver damage becomes established (Supporting Information Table 1). Our results indicate similar numbers of CD134⁺ and CD62L⁻ T_h cells and of inflammatory monocytes in peripheral blood and MLNs in rats on a short course of CCl₄ and in controls. However, animals receiving three doses of CCl₄ showed a discrete expansion ($P < 0.05$) of CD134⁺ and CD62L⁻ T_h cells and of inflammatory monocytes (2.0-, 2.4-, and 2.6-fold increases, respectively) in HLNs.

Table 4. Immunophenotypic Profile of T and B Lymphocytes and Monocytes in Peripheral Blood, MLNs, and HLNs of Placebo- or Antibiotic-Treated Rats with Cirrhosis

Immune Cell Subsets	Peripheral Blood (cells/ μ L)		MLNs (cells/node $\times 10^{-3}$)		HLNs (cells/node $\times 10^{-3}$)	
	Placebo-Treated Rats with Cirrhosis (n = 7)	Antibiotic-Treated Rats with Cirrhosis (n = 7)	Placebo-Treated Rats with Cirrhosis (n = 7)	Antibiotic-Treated Rats with Cirrhosis (n = 7)	Placebo-Treated Rats with Cirrhosis (n = 7)	Antibiotic-Treated Rats with Cirrhosis (n = 7)
T cells (CD3 ⁺)	1,411 \pm 424	1,235 \pm 447	6,417 \pm 3,712	3,111 \pm 1,477†	2,631 \pm 1,483	2,783 \pm 1,411
Total T _h (CD4 ⁺ CD8 ⁻)	982 \pm 262	902 \pm 300	4,765 \pm 2,880	2,390 \pm 1,125†	2,109 \pm 1,261	2,274 \pm 1,798
Recently activated T _h (CD134 ⁺)	99 \pm 57	94 \pm 60	501 \pm 357	155 \pm 90*	349 \pm 164	376 \pm 193
Effector T _h (CD62L ⁻)	137 \pm 40	207 \pm 132	1791 \pm 796	598 \pm 230‡	905 \pm 513	847 \pm 412
Total T _c (CD4 ⁻ CD8 ⁺)	326 \pm 171	306 \pm 152	1426 \pm 594	669 \pm 344‡	451 \pm 204	426 \pm 498
Effector T _c (CD62L ⁻)	32 \pm 18	36 \pm 45	255 \pm 151	72 \pm 31	57 \pm 46	24 \pm 14
B cells (CD45RA ⁺)	925 \pm 380	903 \pm 438	5,820 \pm 2,495	2,979 \pm 1,216†	1,638 \pm 650	1,321 \pm 854
Activated B cells (CD80 ⁺)	30 \pm 19	26 \pm 14	175 \pm 110	55 \pm 30*	67 \pm 31	55 \pm 48
Monocytes (CD3 ⁻ CD45RA ⁻ NK-RP1A ^{high} -CD11b ^{bright} +))	570 \pm 319	320 \pm 182	70 \pm 45	15 \pm 8†	44 \pm 21	38 \pm 20
Inflammatory monocytes (CD43 ⁻ NK-RP1A ^{med} +))	72 \pm 41	66 \pm 35	41 \pm 27	6 \pm 3†	16 \pm 9	16 \pm 10
Dendritic cells (CD3 ⁻ CD45RA ⁻ OX62 ⁺ RT1B ^{bright} +))	15 \pm 7	14 \pm 6	119 \pm 72	29 \pm 17†	64 \pm 38	90 \pm 46

Abbreviation: T_c, T cytotoxic.

*P < 0.001 versus placebo-treated rats with cirrhosis.

†P < 0.01 versus placebo-treated rats with cirrhosis.

‡P < 0.05 versus placebo-treated rats with cirrhosis.

Discussion

In this study, we tested the hypotheses that (1) systemic activation of the inflammatory immune system occurs in the compensated, pre-ascitic stage of experimental cirrhosis and (2) this immune activation is mainly induced in the draining lymph nodes of the liver and/or intestine. Our findings indicate that in rats with cirrhosis, the proinflammatory immune system is activated at the systemic level before ascites appearance. Such a proinflammatory state is concurrent with expansion of activated T cells and monocytes

in the HLNs, which at this stage of cirrhosis constitutes the main source of the expanded activated immune cells present in the peripheral blood. In addition, this study reveals that translocation of enteric bacterial products, as assessed by the presence of bacterial DNA in the MLNs of animals with cirrhosis, occurs in rats without ascites and starts off an inflammatory response restricted to the local environment.

The finding of an intense expansion in the peripheral blood of recently activated CD134⁺- and effector CD62L⁻-T_h cells and inflammatory monocytes, along with increased serum levels of proinflammatory

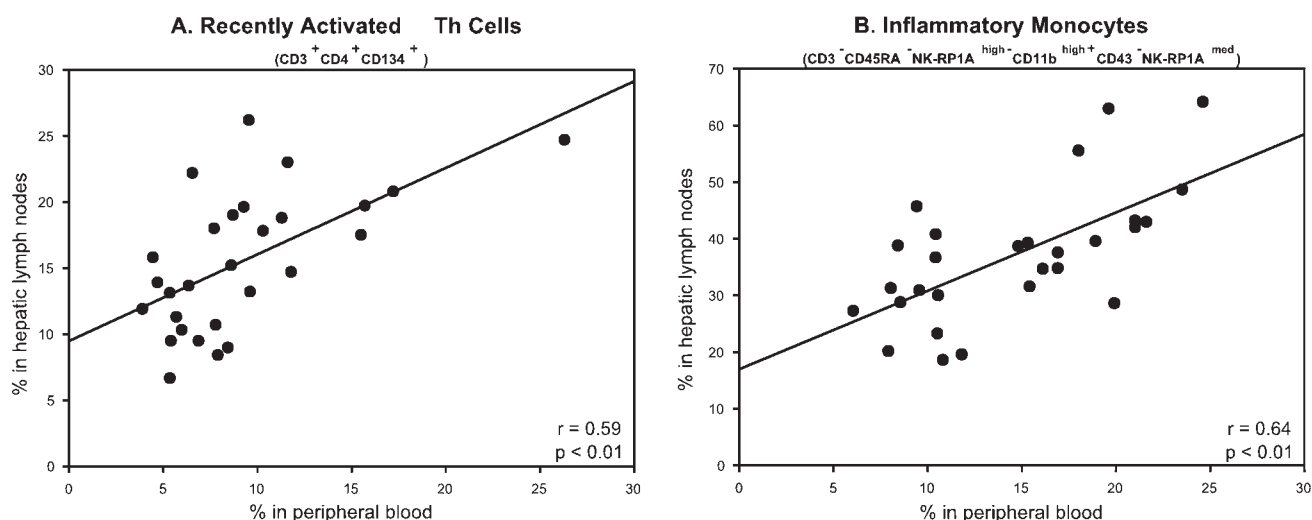


Fig. 3. Direct correlation between the percentage of (A) recently activated (CD134⁺) T_h (CD3⁺CD11b^{bright}-CD4⁺CD8⁻) cells and (B) inflammatory (CD43⁻NK-RP1A^{med}+) monocytes (CD3⁻CD45RA⁻NK-RP1A^{high}-CD11b^{bright}+) present in the blood and HLNs of rats with cirrhosis.

cytokines, is consistent with activation of the inflammatory immune system at the systemic level in pre-ascitic experimental cirrhosis. These data are consistent with a limited number of reports that show expansion of activated monocytes and/or augmented concentrations of proinflammatory cytokines in the peripheral blood of patients with compensated cirrhosis^{4,25,26}; however, to the best of our knowledge, this had not yet been shown in experimental compensated cirrhosis. As in other tissues, immune system responses to hepatic antigens and cellular lesion products can take place in regional draining lymph nodes (HLNs).²³ Activated immune cells recirculate after leaving the

AQ7 HLNs and thereafter can home in different organs, including the inflamed liver. Indeed, direct correlation was observed between circulating activated T_h cells and inflammatory monocytes and these cells present in the HLNs, but not those in the liver.

Our previous study conducted in rats with cirrhosis and ascites identified the MLNs as the source of a systemic immune response triggered by enteric bacteria that thereafter reach the peripheral blood by recirculation of activated immune system cells.⁵ This is in contrast with the situation in rats with compensated cirrhosis, in which recirculation of immune cells preferentially triggered in hepatic but not mesenteric draining lymph nodes seems to be the main source of the activated immune system cells present in the blood. This contention is supported by (1) abrogation by nonabsorbable antibiotics of the ongoing proinflammatory immune response in MLNs, but not in HLNs or peripheral blood, and (2) direct correlation between HLNs and blood proportions of recently activated T_h cells and inflammatory monocytes. Thus, activated immune cells that leave the HLNs and recirculate in peripheral blood preferentially account for the systemic immune activation observed in pre-ascitic rats with cirrhosis.

Our detection of passage of bacterial DNA fragments to the MLNs in pre-ascitic rats with cirrhosis is of particular interest. To date, viable (i.e., positive culture) or nonviable (i.e., DNA fragments) bacteria in the MLNs had only been reported in rats with cirrhosis and ascites.^{6,11,16,27} Similarly, passage of enteric bacterial products to the bloodstream, as shown by

AQ8 increased serum lipopolysaccharide-binding protein or bacterial DNA in serum, has only been demonstrated in patients with cirrhosis and ascites.^{3,10,17,28} In a setting of cirrhosis with ascites, bacterial translocation results from enteric bacterial overload, deranged intestinal permeability, and probably also impaired intestinal immunity, which is unable to eliminate the translo-

cated microorganisms.^{6,16,29} The detection of bacterial genome fragments but not of viable bacteria in the MLNs of our rats with cirrhosis indicates that the mechanisms leading to passage of enteric bacteria to the MLNs are also operative at the pre-ascitic stage of experimental cirrhosis. However, and in contrast to rats with ascites, a functional intestinal immune system is able to eradicate the accessing bacteria. Interestingly, in our study, bacterial CpG motifs, which are immunologically active components of bacterial DNA,³⁰ were able to elicit an inflammatory response in the MLNs with expansion of activated mononuclear cells and production of proinflammatory cytokines. Remarkably, the immune system at the MLNs was able to maintain the inflammatory response to bacterial DNA fragments at the local level. This was revealed by a lack of correlation between the expansion of activated immune cells at the systemic level and the presence of bacterial DNA at the MLNs or bowel decontamination with antibiotics.

We sought to detect systemic inflammation in rats with CCl₄ cirrhosis, given that it is the most widely used and clearly characterized toxin-based experimental model of cirrhosis. This model has been shown to effectively mimic many of the features of human cirrhosis associated with toxic damage.³¹⁻³³ Thus, intoxication with CCl₄ elicits a liver response that sequentially involves acute liver damage (at 2-3 weeks of intoxication), fibrosis (at 4-6 weeks), and cirrhosis (at 12 weeks).³¹⁻³³ The inflammation observed in our experimental model at the systemic level was attributed to cirrhosis and not to the liver inflammatory response to CCl₄ for the following reasons: (1) No systemic immune system abnormalities were produced after a short course of CCl₄. We determined the effects of CCl₄ by examining the phenotype and activation status of cell subpopulations in different compartments of the immune system before cirrhosis developed. It has been reported that a single dose or a few doses of CCl₄ lead to acute liver damage characterized by steatosis, necrosis, and apoptosis of hepatocytes.^{31,34,35} However, at least 4 weeks of CCl₄ administration are needed for liver fibrosis to develop.^{34,36} After the short course of CCl₄, we observed a slight inflammation response at the HLNs, but not the MLNs or peripheral blood. This finding is in agreement with the results from other laboratories, which indicate neither gut wall damage nor bacterial translocation to MLNs in rats receiving a short course of orally administered CCl₄.³⁷ Thus, the immunological disturbance observed in our rats with cirrhosis cannot be ascribed to a direct effect of CCl₄ on immune system cells, nor to a

secondary response to the non-cirrhosis-related liver damage induced by CCl₄. (2) Similarly, systemic inflammation in other experimental models of cirrhosis, such as biliary cirrhosis, provides additional support linking the inflammatory response in peripheral blood detected here to cirrhosis rather than to CCl₄ toxicity. Indeed, activation of circulating monocytes and of T_h cells has been shown in mice and rats with cirrhosis induced by bile duct ligation.^{9,14} (3) The presence of significant transaminitis in our rats with cirrhosis, indicating severe inflammation and hepatocellular necrosis, would have weakened our model and the proposed link between systemic inflammation and cirrhosis.

The notion of a systemic inflammatory immune response associated with cirrhosis is also supported by the observed increases in serum TNF α and IL-6 levels. However, in view of the notorious variability among the available assays, these slight yet significant increases in the concentrations of both cytokines should be interpreted with caution. Nevertheless, it should also be noted that, in sharp contrast to the acute systemic inflammatory reaction of the immune system produced in response to intense stimulation (e.g., intravenous lipopolysaccharide injection, Jarisch-Herxheimer reaction), increases in serum levels of proinflammatory cytokines in chronic local or systemic inflammation are characteristically moderate. In addition, the volume of distribution of TNF α is high, such that a mild increase in serum TNF α could mean a dramatic increase in the number of extracellular TNF α molecules.³⁸ Finally, TNF α is an active molecule, and slight increases in its serum levels could induce substantial biological effects on immune and nonimmune cells.³⁸

In conclusion, the results of this study suggest a critical role of the liver and its draining lymph nodes in inducing the systemic immune disturbance of compensated cirrhosis. They also extend the view of cirrhosis as a disease in which immunomediated mechanisms, which change from the compensated (pre-ascitic) to the decompensated (ascitic) stage, play a key pathogenetic role. Expansion of activated immune cells in the peripheral circulation and a rise in proinflammatory cytokines occurs in experimental compensated cirrhosis. However, unlike in cirrhosis with ascites, the predominant activation site of recirculating immune cells seems to be the draining lymph nodes of the liver and not the MLNs. The molecular and cellular mechanisms underlying this newly discovered immunological effect of the liver with cirrhosis remain to be elucidated.

Acknowledgment: We thank Ana Burton for her assistance with the English translation.

References

1. Delves PJ, Roitt IM. The immune system. First of two parts. *N Engl J Med* 2000;343:37-49.
2. Henson PM. Dampening inflammation. *Nat Immunol* 2005;6:1179-1181.
3. Albillos A, de la Hera A, González M, Moya JL, Calleja JL, Monserrat J, et al. Increased lipopolysaccharide binding protein in cirrhotic patients with marked immune and hemodynamic derangement. *HEPATOLOGY* 2003;37:208-217.
4. Albillos A, de la Hera A, Reyes E, Monserrat J, Muñoz L, Nieto M, et al. Tumour necrosis factor- α expression by activated monocytes and altered T-cell homeostasis in ascitic alcoholic cirrhosis: amelioration with norfloxacin. *J Hepatol* 2004;40:624-631.
5. Muñoz L, Albillos A, Nieto M, Reyes E, Lledó L, Monserrat J, et al. Mesenteric Th1 polarization and monocyte TNF- α production: first steps to systemic inflammation in rats with cirrhosis. *HEPATOLOGY* 2005;42:411-419.
6. Guarner C, González-Navajas JM, Sánchez E, Soriano G, Francés R, Chiva M, et al. The detection of bacterial DNA in blood of rats with CCl₄-induced cirrhosis with ascites represents episodes of bacterial translocation. *HEPATOLOGY* 2006;44:633-639.
7. Francés R, Zapater P, González-Navajas JM, Muñoz C, Caño R, Moreau R, et al. Bacterial DNA in patients with cirrhosis and noninfected ascites mimics the soluble immune response established in patients with spontaneous bacterial peritonitis. *HEPATOLOGY* 2008;47:978-985.
8. Wiest R, Das S, Cadelina G, Garcia-Tsao G, Milstien S, Groszmann RJ. Bacterial translocation in cirrhotic rats stimulates eNOS-derived NO production and impairs mesenteric vascular contractility. *J Clin Invest* 1999;104:1223-1233.
9. Kerfoot SM, D'Mello C, Nguyen H, Ajuebor MN, Kubes P, Le T, et al. TNF- α -secreting monocytes are recruited into the brain of cholestatic mice. *HEPATOLOGY* 2006;43:154-162.
10. González-Navajas JM, Bellot P, Francés R, Zapater P, Muñoz C, García-Pagán JC, et al. Presence of bacterial-DNA in cirrhosis identifies a subgroup of patients with marked inflammatory response not related to endotoxin. *J Hepatol* 2008;48:61-67.
11. García-Tsao G, Lee FY, Barden GE, Cartun R, West AB. Bacterial translocation to mesenteric lymph nodes is increased in cirrhotic rats with ascites. *Gastroenterology* 1995;108:1835-1841.
12. Clària J, Jiménez W. Experimental models of cirrhosis and ascites. In: Ginés P, Arroyo V, Rodés J, Schrier RW, eds. *Ascites and Renal Dysfunction in Liver Disease*. Oxford, UK: Blackwell Publishing; 2005:215-226.
13. Crispe IN. Isolation of mouse intrahepatic lymphocytes. *Curr Protoc Immunol* 2001;Chapter 3:Unit 3.21.
14. Albillos A, Nieto M, Ubeda M, Muñoz L, Fraile B, Reyes E, et al. The biological response modifier AM3 attenuates the inflammatory cell response and hepatic fibrosis in rats with biliary cirrhosis. *Gut* 2010;59:943-952.
15. Runyon B, Sugano S, Kanel G, Mellencamp M. A rodent model of cirrhosis, ascites, and bacterial peritonitis. *Gastroenterology* 1991;100:489-493.
16. Pérez-Páramo M, Muñoz J, Albillos A, Freile I, Portero F, Santos M, et al. Effect of propranolol on the factors promoting bacterial translocation in cirrhotic rats with ascites. *HEPATOLOGY* 2000;31:43-48.
17. Such J, Francés R, Muñoz C, Zapater P, Casellas JA, Cifuentes A, et al. Detection and identification of bacterial DNA in patients with cirrhosis and culture-negative, non-neutrocytic ascites. *HEPATOLOGY* 2002;36:135-141.
18. Von Andrian UH, Mackay CR. T-cell function and migration. Two sides of the same coin. *N Engl J Med* 2000;343:1020-1034.
19. Geissmann F, Jung S, Littman DR. Blood monocytes consist of two principal subsets with distinct migratory properties. *Immunity* 2003;19:71-82.
20. Steiniger B, Stehling O, Scriba A, Grau V. Monocytes in the rat: phenotype and function during acute allograft rejection. *Immunol Rev* 2001;184:38-44.

21. Yrlid U, Jenkins CD, MacPherson GG. Relationships between distinct blood monocyte subsets and migrating intestinal lymph dendritic cells in vivo under steady-state conditions. *J Immunol* 2006;176:4155-4162.
22. Shirachi M, Sata M, Miyajima I, Tanaka M, Tanikawa K. Liver-associated natural killer activity in cirrhotic rats. *Microbiol Immunol* 1998;42:117-124.
23. Bowen DG, Zen M, Holz L, Davis T, McCaughan GW, Bertolino P. The site of primary T cell activation is a determinant of the balance between intrahepatic tolerance and immunity. *J Clin Invest* 2004;114:701-712.
24. Tilney NL. Patterns of lymphatic drainage in the adult laboratory rat. *J Anat* 1971;109:369-383.
25. Tilg H, Wilmer A, Vogel W, Herold M, Nolchen B, Judmaier G, et al. Serum levels of cytokines in chronic liver diseases. *Gastroenterology* 1992;103:264-274.
26. Devière J, Content J, Denys C, Vandenbussche P, Schandene L, Wybran J, et al. Excessive in vitro bacterial lipopolysaccharide-induced production of monokines in cirrhosis. *HEPATOLOGY* 1990;11:628-634.
27. Albillos A, de-la-Hera A, Alvarez-Mon M. Experimental models of spontaneous bacterial peritonitis. In: Ginés P, Arroyo V, Rodés J, Schrier RW, eds. *Ascites and Renal Dysfunction in Liver Disease*. Oxford, UK: Blackwell Publishing; 2005:411-421.
28. Zapater P, Francés R, González-Navajas JM, de la Hoz MA, Moreu R, Pascual S, et al. Serum and ascitic fluid bacterial DNA: a new independent prognostic factor in noninfected patients with cirrhosis. *HEPATOLOGY* 2008;48:1924-1931.
29. Albillos A, de la Hera A. Multifactorial gut barrier failure in cirrhosis: working out the role of probiotics and antioxidants. *J Hepatol* 2002;37:523-526.
30. Krieg AM. CpG motifs in bacterial DNA and their immune effects. *Annu Rev Immunol* 2002;20:709-760.
31. Tamayo RP. Is cirrhosis of the liver experimentally produced by CCl₄ an adequate model of human cirrhosis? *HEPATOLOGY* 1983;3:112-120.
32. Tsukamoto H, Matsuoka M, French SW. Experimental models of hepatic fibrosis: a review. *Semin Liver Dis* 1990;10:56-65.
33. Constandinou C, Henderson N, Iredale JP. Modeling liver fibrosis in rodents. *Methods Mol Med* 2005;117:237-250.
34. Iredale JP, Benyon RC, Pickering J, McCullen M, Northrop M, Pawley S, et al. Mechanisms of spontaneous resolution of rat liver fibrosis. Hepatic stellate cell apoptosis and reduced hepatic expression of metalloproteinase inhibitors. *J Clin Invest* 1998;102:538-549.
35. Hartley DP, Kolaja KL, Reichard J, Petersen DR. 4-Hydroxynonenal and malondialdehyde hepatic protein adducts in rats treated with carbon tetrachloride: immunochemical detection and lobular localization. *Toxicol Appl Pharmacol* 1999;161:23-33.
36. Teixeira-Clerc F, Julien B, Grenard P, Tran Van Nhieu J, Deveau V, Li L, et al. CB1 cannabinoid receptor antagonism: a new strategy for the treatment of liver fibrosis. *Nat Med* 2006;12:671-676.
37. Llovet JM, Bartolí R, Planas R, Cabré E, Jimenez M, Urban A, et al. Bacterial translocation in cirrhotic rats. Its role in the development of spontaneous bacterial peritonitis. *Gut* 1994;35:1648-1652.
38. Vassalli P. The pathophysiology of tumor necrosis factors. *Ann Rev Immunol* 1992;10:411-452.



Author Proof